

ผลเชิงป้องกันของตรีผลาต่อการตายของเซลล์ประสาทจากการสะสมของธาตุเหล็กและความเป็นพิษ
ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นางสาวศุภมาศ จารุจรณ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The protective effect of Triphala on neuronal cell death mediated by intracellular
iron accumulation and cytotoxicity of H₂O₂

Miss Supamas Charucharana



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลเชิงป้องกันของตรีผลาต่อการตายของเซลล์ประสาท
จากการสะสมของธาตุเหล็กและความเป็นพิษของ
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

โดย

นางสาวศุภมาศ จารุจรณ

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ดร. ซาลิสซา หลุยเจริญ ซีพสุนทร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ซีพสุนทร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ดร. ซาลิสซา หลุยเจริญ ซีพสุนทร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ซีพสุนทร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฐ ทรัพย์วัฒนะ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นุชนาถ ไหมหรือ)

ศุภมาศ จารุจรณ : ผลเชิงป้องกันของตรีผลาต่อการตายของเซลล์ประสาทจากการสะสมของธาตุเหล็กและความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (The protective effect of Triphala on neuronal cell death mediated by intracellular iron accumulation and cytotoxicity of H₂O₂) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร. ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร , อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร, 88 หน้า.

ในปัจจุบันแนวโน้มที่จะพบผู้ป่วยจากโรคความเสื่อมของเซลล์ในระบบประสาทมีมากขึ้น การสะสมของภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองนั้นเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคความเสื่อมของเซลล์ในระบบประสาท การใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติซึ่งสามารถบริโภคได้ในชีวิตประจำวันจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ได้รับความสนใจในการลดการสะสมของภาวะเครียดออกซิเดชันในสมอง ตรีผลาเป็นตำรับยาสมุนไพรซึ่งใช้ในการรักษาโรคและส่งเสริมสุขภาพทางการแพทย์แผนไทยมายาวนาน การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการทดสอบประสิทธิภาพในเชิงป้องกันและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบต่อการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH จากภาวะเครียดออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ซึ่งเป็นปัจจัยร่วมที่อาจนำไปสู่การเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาท ผลการทดลองพบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล อีกทั้งพบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยว สามารถยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทตามความเข้มข้นของสารสกัดน้ำ นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำในการป้องกันการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ การลดการสะสมของระดับ ROS ภายในเซลล์ และฤทธิ์ในการป้องกันโปรตีนคาร์บอนิลเลชัน นอกจากนี้พบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวสามารถควบคุมการแสดงออกของ SOD1, CAT และ GPx1 ในขณะที่เดียวกันสามารถลดการแสดงออกของ caspase-3 รวมถึงเพิ่มสัดส่วนการแสดงออกของ Bcl-2 และ BAX ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำของตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำของสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการตายของเซลล์ประสาท โดยลดการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ ลดการสะสมของ ROS จึงลดการทำลายโปรตีนในเซลล์จากอนุมูลอิสระ โดยผ่านการควบคุมการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระและยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ตำรับยาตรีผลาจึงเป็นตำรับยาสมุนไพรไทยที่ช่วยในการส่งเสริมสุขภาพและอาจมีประโยชน์ในการป้องกันภาวะความเสื่อมของเซลล์ประสาท

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5774127330 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: NEURODEGENERATIVE DISEASES / IRON / ANTIOXIDANT / OXIDATIVE STRESS
/ TRIPHALA

SUPAMAS CHARUCHARANA: The protective effect of Triphala on neuronal cell death mediated by intracellular iron accumulation and cytotoxicity of H₂O₂.

ADVISOR: CHALISA LOUICHAROEN CHEEPSUNTHORN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. POONLARP CHEEPSUNTHORN, Ph.D., 88 pp.

An increase in brain oxidative stress is a major risk factor for neurodegenerative diseases. Thus, reducing oxidative stress may be a powerful therapeutic strategy to prevent neuronal cell damage and loss. Alternative to chemically synthesized drugs, bioactive compounds of natural sources have attracted the interest of modern researchers. In Thai traditional medicine, Triphala (TPL) is a formulation commonly used to promote health and longevity. This study was aimed to evaluate the antioxidant property of TPL water extract on cytoprotective effects against oxidative neuronal cell death induced by iron accumulation and H₂O₂ exposure. The ability of TPL in scavenging free radicals was determined by deoxyribose assay. The cell viability was determined by MTT assay. Intracellular ROS were measured by using a CM-H₂DCFDA assay. Expression of antioxidant enzyme and apoptosis-related genes were determined by qPCR. TPL possesses antioxidant property by scavenging OH⁻ in a concentration dependent manner. Pretreatment with TPL significantly attenuated FAC and H₂O₂-induced loss of SK-N-SH cell viability. In addition, pretreatment with TPL also dose-dependently reduced the intracellular ROS level. The mechanisms underlying cytoprotective effects of TPL are associated with up-regulation of antioxidant enzyme mRNA levels and the ability to decrease the expression of caspase-3 and to increases Bcl-2/BAX expression ratio in these cells. These results support the use of TPL in Thai traditional medicine and its potential antioxidant agent and might be beneficial as potential therapeutic agents for prevention of human neurodegenerative diseases and other disorders caused by oxidative stress.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature

Academic Year: 2016

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีตามความคาดหวังของผู้เขียนด้วยความกรุณาจากคณาจารย์หลายท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนความเสียสละ ความอนุเคราะห์ และน้ำใจจากบุคคลหลายฝ่าย รวมถึงบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในการกรุณาของทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร และ รองศาสตราจารย์ ดร. พูลลาภ ชีพสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณารับเป็นที่ปรึกษาและเสียสละเวลาอันมีค่าในการให้คำแนะนำแนวคิดในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังให้คำปรึกษาและช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน นอกจากนี้ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติการ 828 ทุกคนสำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิษฐ์ ประพันธ์วัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นุชนาถ ไหมหรือ ที่ได้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการจัดทำวิทยานิพนธ์รวมถึงแก้ไขจุดบกพร่องของการเขียนงานวิจัยฉบับนี้

ขอขอบพระคุณครูบาอาจารย์ทุกท่าน และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้ผู้เขียนตลอดระยะเวลาในการศึกษา

สุดท้ายนี้ ผู้เขียนขอขอบพระคุณบิดามารดาและครอบครัว ที่คอยสนับสนุนด้านการเรียนของผู้เขียนเสมอมา ตลอดจนคอยให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	1
สารบัญตาราง.....	4
บทที่ 1 บทนำ.....	5
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	5
1.2 คำถามของการวิจัย.....	6
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	6
1.4 สมมุติฐาน.....	7
1.5 คำสำคัญ.....	7
1.6 รูปแบบการวิจัย.....	7
1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	7
1.8 กรอบแนวคิดการวิจัย.....	8
1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	8
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
2.1 ธาตุเหล็ก.....	9
2.2 ภาวะเครียดออกซิเดชั่น.....	11
2.3 โพรตีนคาร์บอนิลเลชั่น.....	12
2.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระ.....	12
2.5 ภาวะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส.....	14

2.5.1 Extrinsic pathway	14
2.5.2 Intrinsic pathway	15
2.6 โรคจากความเสื่อมของระบบประสาท.....	16
2.7 ตรีผลา	16
2.7.1 สมอไทย	18
2.7.2 สมอพิเภก.....	19
2.7.3 มะขามป้อม	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
3.1 การเตรียมสารสกัดจากตรีผลา	21
3.2 การวัดระดับการต้านอนุมูลไฮดรอกซิลของตรีผลาในหลอดทดลอง	23
3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์	24
3.4 การทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ FAC สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียว	24
3.4.1 การทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์.....	25
3.4.2 การทดสอบความเป็นพิษของ FAC	25
3.4.3 การทดสอบความเป็นพิษของ FAC ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์.....	25
3.4.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียว	25
3.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียว.....	26
3.6 การวัดระดับของธาตุเหล็กภายในเซลล์	27
3.7 การวัดระดับ Reactive Oxygen Species	28
3.8 การสกัดและวัดปริมาณโปรตีน.....	28
3.9 การวัดระดับโปรตีนคาร์บอนิล.....	29

3.10 การสกัดอาร์เอ็นเอ	30
3.11 การสังเคราะห์ cDNA	30
3.12 การวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์และเอนไซม์ต้านอนุมูล อิสระในเซลล์ด้วยเทคนิค real time PCR.....	31
3.13 การวิเคราะห์ข้อมูล	32
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	33
4.1 ผลของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวและจากตำรับยาตรีผลาในการกำจัดอนุมูลไฮดรอก ซิล	33
4.1.1 ฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล	33
4.1.2 ฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวในตำรับยาตรีผลาในการกำจัดอนุมูลไฮดรอก ซิล.....	34
4.2 ระดับความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H ₂ O ₂) ธาตุเหล็ก (FAC) สารสกัดน้ำจาก ตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวในตำรับยาตรีผลาต่อเซลล์ประสาท SK- N-SH.....	37
4.2.1 ความเป็นพิษของธาตุเหล็กต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH.....	37
4.2.2 ความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH.....	37
4.2.3 ความเป็นพิษของธาตุเหล็กร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาท SK-N- SH.....	38
4.2.4 ความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH.....	39
4.2.5 ความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH	40
4.2.6 ความเป็นพิษของ gallic acid ต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH.....	42
4.3 ผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวในการยับยั้งการ ตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH.....	43
4.4 ผลของระดับธาตุเหล็กที่สะสมภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH	44

4.5 ผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรเดี่ยวต่อการยับยั้งการสะสมของ ธาตุเหล็กภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH.....	46
4.6 ผลการยับยั้งของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรเดี่ยวต่อการสะสมของ Reactive Oxygen Species ภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH.....	47
4.7 ผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรเดี่ยวต่อการยับยั้งระดับโปรตีน คาร์บอนิล (protein carbonyl) ของเซลล์ประสาท SK-N-SH.....	49
4.8 ผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรเดี่ยวต่อการแสดงออกของยีนที่ เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ประสาท SK-N-SH.....	50
4.8.1 การแสดงออกของยีนคะตะเลส (CAT).....	51
4.8.2 การแสดงออกของยีนกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส 1 (GPx1).....	52
4.8.3 การแสดงออกของยีนซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส 1 (SOD1).....	53
4.9 ผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรเดี่ยวต่อการแสดงออกของยีนที่ เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์ประสาท SK-N- SH.....	55
4.9.1 ผลการแสดงออกของยีน caspase-3.....	55
4.9.2 ผลการแสดงออกของยีน Bax.....	56
4.9.3 ผลการแสดงออกของยีน Bcl-2.....	58
4.9.4 สัดส่วนผลต่างระหว่างการแสดงออกของยีน Bcl-2 กับ Bax.....	59
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	60
รายการอ้างอิง	71
ภาคผนวก.....	82
ภาคผนวก ก	83
ภาคผนวก ข	85
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	88

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 แสดงการสังเคราะห์สารสื่อประสาทโดปามีนและซีโรโทนิน ทั้งเอนไซม์ tyrosine hydroxylase และ tryptophan hydroxylase ตามลำดับ ซึ่งอาศัยธาตุเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา.....	9
ภาพที่ 2 แสดงการขนส่งธาตุเหล็กผ่าน BBB ทั้งแบบอาศัยโปรตีนทรานสเฟอร์ริน (TBI) และแบบไม่อาศัยโปรตีนทรานสเฟอร์ริน (NTBI) (CP: ceruloplasmin).....	11
ภาพที่ 3 แสดงการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ภายในเซลล์ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเทสเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาการหายใจระดับเซลล์ภายในไมโทคอนเดรีย ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์คะตะเลสและกลูตาไรโอนเปอร์ออกซิเดสช่วยเร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำเพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับเซลล์.....	13
ภาพที่ 4 แสดงการเกิดปฏิกิริยาเฟนตอน (Fenton's reaction) และปฏิกิริยาฮาเบอร์-ไวส์ (Haber-Weiss reaction) ที่มีธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สำคัญ ทำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิลซึ่งมีความเป็นพิษกับเซลล์และเป็นสาเหตุของการตายของเซลล์ประสาท.....	14
ภาพที่ 5 แสดงขั้นตอนการส่งสัญญาณของเซลล์ (cell signaling) ในกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ทั้ง extrinsic pathway และ intrinsic pathway	15
ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ gallic acid [51]	17
ภาพที่ 7 แสดงลักษณะของผลสด (รูปซ้าย) และลักษณะผลแห้ง (รูปขวา) ของสมอไทย.....	18
ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของผลสด (รูปซ้าย) และลักษณะผลแห้ง (รูปขวา) ของสมอพิเภก	19
ภาพที่ 9 แสดงลักษณะของผลสด (รูปซ้าย) และลักษณะผลแห้ง (รูปขวา) มะขามป้อม	20
ภาพที่ 10 แสดงกลุ่มการทดลองในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH ของสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดจากสมุนไพรวัดจากตำรับยาตรีผลา.....	27
ภาพที่ 11 แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา	33
ภาพที่ 12 แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดสมุนไพรวัดเดี่ยว.....	35
ภาพที่ 13 แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดี่ยว.....	36

ภาพที่ 14 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC.....	37
ภาพที่ 15 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย H ₂ O ₂	38
ภาพที่ 16 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC และ H ₂ O ₂	39
ภาพที่ 17 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา.....	40
ภาพที่ 18 แสดง cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียว	41
ภาพที่ 19 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย gallic acid	42
ภาพที่ 20 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดเดียวก่อนถูกกระตุ้นด้วย FAC กับ H ₂ O ₂	44
ภาพที่ 21 แสดงปริมาณความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ calcein เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC เพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H ₂ O ₂	45
ภาพที่ 22 แสดงปริมาณความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ calcein ในเซลล์ประสาท SK-N-SH	47
ภาพที่ 23 แสดงปริมาณ ROS ภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH.....	48
ภาพที่ 24 แสดงระดับ protein carbonyl ของเซลล์ประสาท SK-N-SH.....	50
ภาพที่ 25 แสดงผลการแสดงออกของยีน CAT	52
ภาพที่ 26 แสดงผลการแสดงออกของยีน GPx1	53
ภาพที่ 27 แสดงผลการแสดงออกของยีน SOD1	54
ภาพที่ 28 แสดงผลการแสดงออกของยีน caspase-3	56
ภาพที่ 29 แสดงผลการแสดงออกของยีน Bax.....	57
ภาพที่ 30 แสดงผลการแสดงออกของยีน Bcl-2	58
ภาพที่ 31 แสดงสัดส่วนระหว่างการแสดงออกของยีน Bcl-2 กับ Bax.....	59
ภาพที่ 32 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ gallic acid หรือ 3,4,5-trihydroxybenzoic acid	64

ภาพที่ 33 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Pyrogallol จัดอยู่ในกลุ่มของ galloyl group มีลักษณะโครงสร้างแบบ trihydroxy benzene.....	64
ภาพที่ 34 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Pyrocatechol จัดอยู่ในกลุ่มของ catechol group มีลักษณะโครงสร้างแบบ dihydroxybenzene.....	64
ภาพที่ 35 สรุปผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากการสะสมของธาตุเหล็กและความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (เส้นทึบแสดงผลกระทบทางตรง เส้นประแสดงผลกระทบทางอ้อม).....	69



สารบัญตาราง

ตาราง 1 แสดงผลผลิตร้อยละของสารสกัดตรีผลา	22
ตาราง 2 แสดงผลผลิตร้อยละของสารสกัดเดี่ยวทั้ง 3 ชนิดจากตำรับยาตรีผลา ได้แก่ สมอไทย (T. Chebula) สมอพิเภก (T. Bellerica) และ มะขามป้อม (P. Emblica).....	23
ตาราง 3 แสดงไพรเมอร์จำเพาะ (specific primers) ที่นำมาใช้ในการวัดระดับการแสดงออกของยีน catalase (CAT), superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1), caspase3, Bax และ Bcl-2 ด้วยวิธี real time PCR	32



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาทเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดอาการแสดงในกลุ่มโรคที่เรียกว่า neurodegenerative diseases เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) และ amyotrophic lateral sclerosis (ALS) แม้ในปัจจุบันจะยังไม่สามารถระบุสาเหตุหลักของการเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาทในโรคกลุ่มนี้ได้ พบว่าประมาณร้อยละ 90-95 ของผู้ป่วยจะเป็นผู้สูงอายุ แสดงว่าอายุเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งของการเกิดโรค (1, 2)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นและพบเห็นร่วมกันในสมองของผู้สูงอายุที่เป็นโรคกลุ่มนี้คือ การสะสมของธาตุเหล็ก (iron) ในเนื้อสมองที่มากกว่าปกติ (3) ถึงแม้ว่าธาตุเหล็กจะมีความสำคัญต่อพัฒนาการของสมอง การเรียนรู้ (4) และการทำงานของเซลล์ประสาท เช่น ในกระบวนการสร้างพลังงานในรูปของ ATP จากไมโทคอนเดรีย การสังเคราะห์สารสื่อประสาท (neurotransmitter) แคทีโคลามีน (catecholamine) และเซโรโทนิน (serotonin) เป็นต้น โดยธาตุเหล็กจะทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ให้กับเอนไซม์หลายชนิดในกระบวนการดังกล่าว (5) แต่ด้วยคุณสมบัติที่สามารถให้และรับอิเล็กตรอน (redox-active metal) ทำให้ธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สำคัญในการสร้างอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับเยื่อหุ้มเซลล์ สารพันธุกรรม และโครงสร้างต่างๆ ภายในเซลล์ จึงเป็นไปได้ว่าการสะสมของธาตุเหล็กในเนื้อสมองที่มากกว่าปกติจะเป็นปัจจัยร่วมสำคัญที่นำไปสู่การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) การเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาทในผู้ป่วยด้วยโรค neurodegenerative diseases

ในปัจจุบันแนวโน้มที่จะพบผู้ป่วยจากโรคความเสื่อมของเซลล์ในระบบประสาทมีมากขึ้น การนำสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สามารถบริโภคได้ในชีวิตประจำวันมาใช้ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ใช้ป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาทได้ ตรีผลา (Triphala) เป็นตำรับยาสมุนไพรที่มีใช้ทางการแพทย์อายุรเวท (Ayurvedic medicine) ของอินเดียและการแพทย์แผนไทยมายาวนาน ใช้ในการรักษาโรคและส่งเสริมสุขภาพ ประกอบไปด้วยสมุนไพร 3 ชนิด ที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ได้แก่ สมอไทย สมอพิเภก และมะขามป้อม เนื่องจากมีรายงานว่า สารสกัดจากสมอไทยและมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (6) สามารถยับยั้งการตายของเซลล์ ต้านการอักเสบ ลดอาการซึมเศร้า โดยออกฤทธิ์ในการควบคุมสารสื่อประสาท ทั้งยังเพิ่มความจำและการเรียนรู้ในหนูทดลอง (7, 8) ดังนั้น จึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบประสิทธิภาพในเชิงป้องกัน และกลไกการออกฤทธิ์ของตรีผลาต่อการตายของเซลล์ประสาทจาก

ภาวะเครียดออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ ซึ่งเป็นปัจจัยร่วมที่อาจนำไปสู่การเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาทในโรคกลุ่ม neurodegenerative diseases ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

1.2 คำถามของการวิจัย

- 1.2.1 สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดจากตำรับยาตรีผลาสามารถยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ได้หรือไม่
- 1.2.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาดีกว่า สารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบของตำรับยาหรือไม่
- 1.2.3 สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดจากตำรับยาตรีผลาสามารถยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ โดยลดการสร้างอนุมูลอิสระ ลดการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ ยับยั้งการแสดงออกของโมเลกุลที่ส่งเสริมการตายและเพิ่มการแสดงออกของโมเลกุลที่ต้านการตายของเซลล์ได้หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.3.1 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดจากตำรับยาตรีผลาในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์
- 1.3.2 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบของตำรับยาในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์
- 1.3.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดจากตำรับยาตรีผลา

1.4 สมมุติฐาน

- 1.4.1 สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวจากตำรับยาตรีผลาสามารถยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ได้
- 1.4.2 สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบของตำรับยา ในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์
- 1.4.3 ฤทธิ์ในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวจากตำรับยาตรีผลาอาจเกิดจากประสิทธิภาพในการลดการสร้างอนุมูลอิสระ ลดการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ ยับยั้งการแสดงออกของโมเลกุลที่ส่งเสริมการตายและเพิ่มการแสดงออกของโมเลกุลที่ต้านการตายของเซลล์

1.5 คำสำคัญ

โรคจากความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative disorders)
 ธาตุเหล็ก (Iron)
 สารต้านการออกซิไดส์ (Antioxidants)
 ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress)
 ตรีผลา (Triphala)

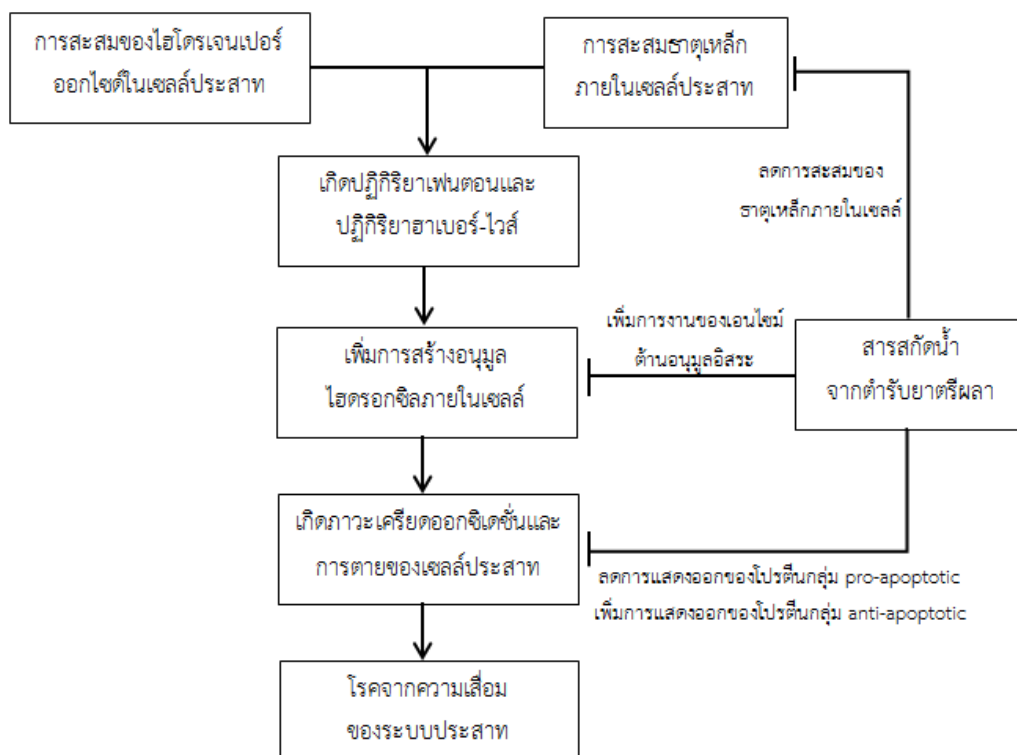
1.6 รูปแบบการวิจัย

วิจัยเชิงทดลอง (Experimental design)

1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

ไม่มี

1.8 กรอบแนวคิดการวิจัย



1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

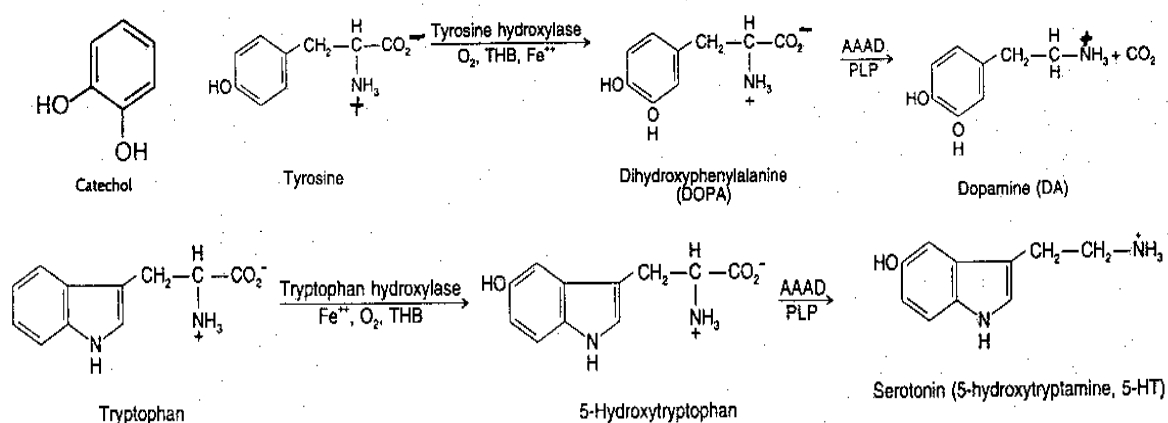
ทำให้ทราบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาสมุนไพรในการป้องกันอนุมูลอิสระและยับยั้งความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับการสะสมของธาตุเหล็กที่มีผลต่อการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ ในการป้องกันภาวะความเสื่อมของเซลล์ประสาทและสามารถนำไปสู่การเกิดโรค neurodegenerative disease ที่พบได้มากในสมองของผู้สูงอายุ

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ธาตุเหล็ก

ธาตุเหล็ก (Iron) เป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อร่างกาย ด้วยธาตุเหล็กเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ เช่น ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนและ co-enzyme Q, cytochrome C ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) นอกจากนี้ธาตุเหล็กยังทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ต่างๆ ในกระบวนการสังเคราะห์สารสื่อประสาท เช่น เอนไซม์ tyrosine hydroxylase ในการสร้าง dihydroxyphenylalanine (DOPA) จากไทโรซีน (tyrosine) ด้วยปฏิกิริยา hydroxylation ซึ่ง DOPA เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารสื่อประสาทกลุ่มแคทีโคลามีน (9) และเอนไซม์ tryptophan hydroxylase ในการเปลี่ยนทริปโตเฟน (tryptophan) ให้เป็นซีโรโทนิน (ภาพที่ 1) (10) นอกจากนี้ธาตุเหล็กยังมีความเกี่ยวข้องกับการทำลายสารสื่อประสาทด้วยการเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) ในการสลายโดปามีน อะดรีนาลีน และนอร์อะดรีนาลีน (5)

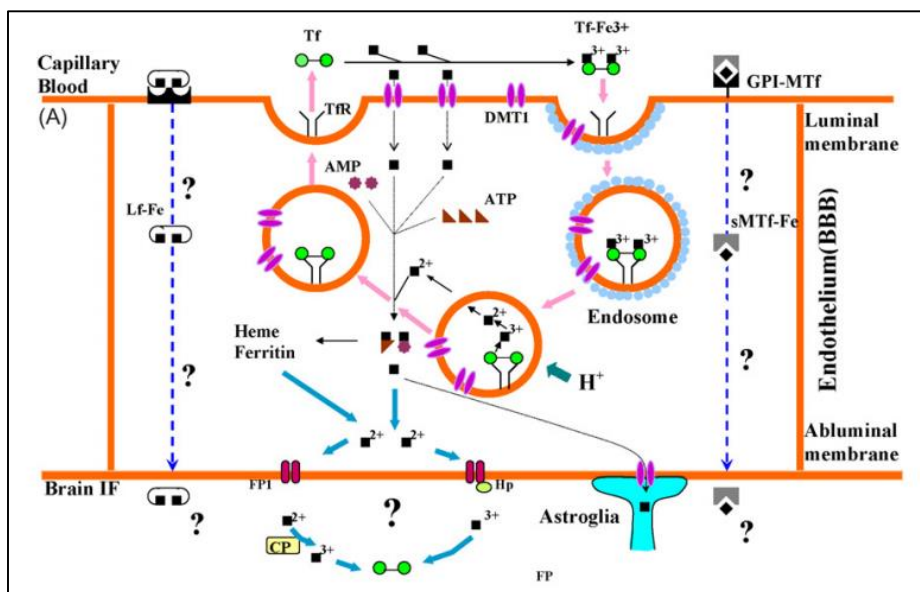


ภาพที่ 1 แสดงการสังเคราะห์สารสื่อประสาทโดปามีนและซีโรโทนิน ทั้งเอนไซม์ tyrosine hydroxylase และ tryptophan hydroxylase ตามลำดับ ซึ่งอาศัยธาตุเหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา

(รูปจาก www.benbest.com)

การหมุนเวียนของธาตุเหล็กในร่างกายประกอบไปด้วยธาตุเหล็ก 2 อนุพันธ์ คือ เฟอร์รัสไอออน (ferrous; Fe^{2+}) และเฟอร์ริกไอออน (ferric; Fe^{3+}) ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบการขนส่ง การดูดซึมและการสะสมธาตุเหล็กของร่างกาย การหมุนเวียนสลับกันไปมาของธาตุเหล็กในรูปแบบนี้ขึ้นอยู่กับกลไกของร่างกายที่จะนำธาตุเหล็กไปใช้ ธาตุเหล็กที่พบในอาหารที่รับประทานส่วนใหญ่ที่ร่างกายรับเข้ามานั้นอยู่ในรูปของเฟอร์รัสไอออน โดยธาตุเหล็กที่รับประทานเข้าไปจะถูกดูดซึมผ่านเยื่อบุลำไส้เข้าสู่กระแสเลือด ธาตุเหล็กจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเฟอร์ริกไอออนโดยเอนไซม์ ferroxidase จากนั้นจะจับกับโปรตีนทรานสเฟอริน (transferrin) และจะถูกขนส่งผ่านกระแสเลือดไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย (11) ธาตุเหล็กที่อยู่ในกระแสเลือดสามารถเข้าสู่สมองได้ 2 วิธี คือ ผ่านทาง blood-brain barrier (BBB) และ blood-cerebrospinal fluid barrier (B-CSF) พบว่าธาตุเหล็กร้อยละ 80 จะผ่านเข้าทาง BBB (ภาพที่ 2) โดยธาตุเหล็กจะถูกขนส่งได้ทั้งแบบอาศัยโปรตีนทรานสเฟอริน (transferrin bound iron; TBI) และแบบไม่อาศัยโปรตีนทรานสเฟอริน (non-transferrin bound iron; NTBI) ซึ่งธาตุเหล็กที่ขนส่งในรูป TBI นั้นจะอาศัยโปรตีนทรานสเฟอริน (Tf) จับกับ transferrin receptor (TfR) ที่เยื่อบุผนังหลอดเลือด ผ่าน luminal membrane ของ BBB โดยกระบวนการ endocytosis ซึ่งภายใน endosomes นั้นจะมีค่า pH เป็นกรด ทำให้ธาตุเหล็กหลุดออกจาก Tf-TfR complex และจะถูกขนส่งเข้าสู่ interstitial fluid (IF) ของสมองโดยผ่าน ferroprotein1 (FP1) และ hephaestin (Hp) ส่วน Tf-TfR complex จะถูกนำกลับไปใช้ในการขนส่งธาตุเหล็กครั้งต่อไป นอกจากธาตุเหล็กจะขนส่งผ่าน Tf/TfR pathway แล้ว ยังพบว่าธาตุเหล็กอาจจะขนส่งผ่าน BBB โดยอาศัยโปรตีน เช่น lactoferrin (Lf), GPI-anchored melanotransferrin (MTf), soluble melanotransferrin (sMTf) และ divalent metal transporter-1 (DMT1) ได้อีกด้วย ธาตุเหล็กที่ผ่านเข้ามาในเซลล์จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์และจะถูกเก็บอยู่ภายในเซลล์ในรูปของ ferritin (12, 13)

จากการศึกษาของ Burner และคณะพบว่าธาตุเหล็กส่งเสริมพัฒนาการด้านการเรียนรู้และความจำในวัยรุ่น (14) ดังนั้นการขาดธาตุเหล็กในวัยเด็กและวัยรุ่นส่งผลต่อความผิดปกติของการเรียนรู้ ความจำ การสังเคราะห์ไมอีลินและการสร้างสารสื่อประสาท (4) ทำให้มีการแสดงออกของโดปามีน ตัวรับโดปามีน (dopamine receptor) ซีโรโทนิน และนอร์อะดรีนาลีนลดลง (9, 15, 16) อย่างไรก็ตามในทางกลับกันก็มีรายงานการสะสมของธาตุเหล็กในสมองที่เพิ่มมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น และยังพบการสะสมของธาตุเหล็กในสมองของผู้ที่เป็นโรคกลุ่ม neurodegenerative disorders เช่น โรคอัลไซเมอร์ และ โรคพาร์กินสัน (3, 17-19)



ภาพที่ 2 แสดงการขนส่งธาตุเหล็กผ่าน BBB ทั้งแบบอาศัยโปรตีนทรานสเฟอริน (Tf) และแบบไม่อาศัยโปรตีนทรานสเฟอริน (NTf) (CP: ceruloplasmin) (รูปภาพ (13))

2.2 ภาวะเครียดออกซิเดชัน

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) คือ การที่เซลล์อยู่ในสภาวะขาดสมดุลระหว่างระดับของสารออกซิไดซ์ และสารต้านการออกซิไดซ์ภายในเซลล์ เป็นภาวะการสูญเสียการทำหน้าที่กำจัดสารพิษภายในเซลล์ ทำให้เกิดการสะสมของอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวมาก ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical; O_2^-), อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical; OH^\cdot) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยโมเลกุลเหล่านี้เมื่อมีการสะสมภายในเซลล์เป็นจำนวนมากจะส่งผลให้เกิดการทำลายแบบออกซิเดชัน (oxidative damage) ต่อชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ของเซลล์ (macromolecules) เช่น การทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) การทำลายสภาพโปรตีน (protein denaturation) การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (lipid peroxidation) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบรายงานว่าภาวะเครียดออกซิเดชันยังมีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ประสาทซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพาร์กินสัน, โรค อัลไซเมอร์ และ Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) เป็นต้น (20-22)

2.3 โปรตีนคาร์บอนิลเลชัน

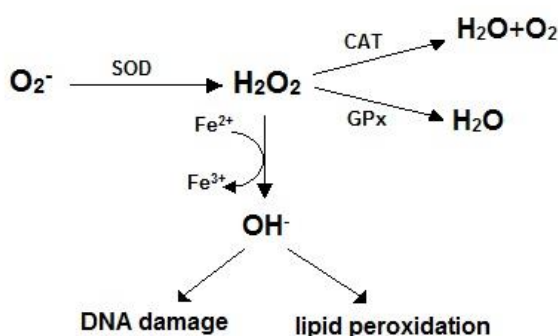
โปรตีนคาร์บอนิลเลชัน (Protein carbonylation) เป็นสภาวะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนเมื่อเกิด oxidative stress จากระดับ ROS ที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีโลหะเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยา จะเกิดปฏิกิริยาโดยตรงกับโปรตีน ทำให้โปรตีนถูกออกซิไดซ์และจะมีหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group; CO) มาเกาะบริเวณ side chain ของโปรตีน โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นที่กรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ ไลซีน (lysine) อาร์จินีน (arginine) โพรลีน (proline) และ ทรีโอนีน (Threonine) (23) การเกิด carbonylation ของโปรตีน หรือเรียกอีกอย่างว่าการเกิดโปรตีนคาร์บอนิล (protein carbonyl) นั้นเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้โปรตีนทำงานผิดปกติ ส่งผลให้การทำงานของเซลล์ในร่างกายผิดปกติไป และเมื่อระดับของโปรตีนที่ผิดปกติเหล่านี้สะสมมากขึ้น อาจนำไปสู่สาเหตุของโรคต่างๆ ได้ (24, 25) ระดับของ protein carbonylation จึงนิยมนำมาใช้เป็น biomarker ของ oxidative damage ของโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำจากภาวะ oxidative stress (26)

ถ้า protein carbonylation เกิดขึ้นในเซลล์ของระบบประสาท ย่อมส่งผลให้มีการสะสมของโปรตีนที่ผิดปกติมากขึ้น อันนำไปสู่โรคความเสื่อมของระบบประสาทได้ (27) มีการศึกษาพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ protein carbonyl ในเซลล์ประสาทนั้นมีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกลุ่ม neurodegenerative disease (28) นอกจากนี้ยังพบการสะสมของโปรตีนออกซิเดชันซึ่งจะนำไปสู่การเกิดโปรตีนคาร์บอนิลในโรค อัลไซเมอร์, พาร์กินสัน, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) และ multiple sclerosis (29-32) จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น การลดระดับของ ROS ภายในเซลล์ประสาท จึงอาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการป้องกันการเกิด protein carbonylation ซึ่งอาจจะป้องกันโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ในระบบประสาทได้

2.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระ

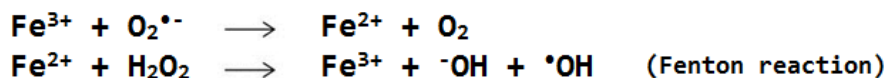
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species: ROS) ชนิดหนึ่งที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจนภายในไมโทคอนเดรีย ในสภาวะปกติไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตออกมาจะถูกควบคุมเพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ คะตะเลส (catalase; CAT) ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase; GSH-Px) โดยซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาสลายอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) โดยจะเปลี่ยนอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจน เมื่อร่างกายมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นเอนไซม์กะตะเลสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้

เป็นน้ำและออกซิเจน ส่วนเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสทำหน้าที่ในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำ (33) (ภาพที่ 3) เพื่อป้องกันไม่ให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล หากเอนไซม์เหล่านี้สูญเสียความสามารถในการรักษาสมดุลของระดับการทำงาน จะส่งผลให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ปริมาณมาก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับธาตุเหล็ก ทำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^{\cdot}) ปฏิกิริยานี้เรียกว่าเฟนตอน (Fenton's reaction) อนุมูลไฮดรอกซิลยังเกิดขึ้นได้จากปฏิกิริยาฮาเบอร์-ไวส์ (Haber-Weiss reaction) โดยอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อยู่ภายในเซลล์ โดยอาศัยธาตุเหล็กในรูปอิสระที่สะสมอยู่ในเซลล์เป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา (34, 35) (ภาพที่ 4) มีรายงานเกี่ยวกับปริมาณธาตุเหล็กที่เพิ่มสูงขึ้นนั้นมีความสัมพันธ์ต่อการเพิ่มขึ้นของภาวะเครียดออกซิเดชันโดยผ่านกระบวนการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลไฮดรอกซิลโดยผ่านปฏิกิริยาเฟนตอน อนุมูลไฮดรอกซิลเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง สามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ภายในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น (36, 37)

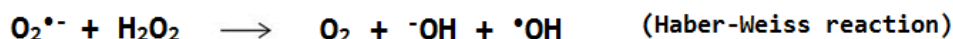


ภาพที่ 3 แสดงการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ภายในเซลล์ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาการหายใจระดับเซลล์ภายในไมโทคอนเดรีย ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์คะตะเลสและกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสช่วยเร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำเพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับเซลล์

(รูปดัดแปลงจาก (33))



the net reaction:



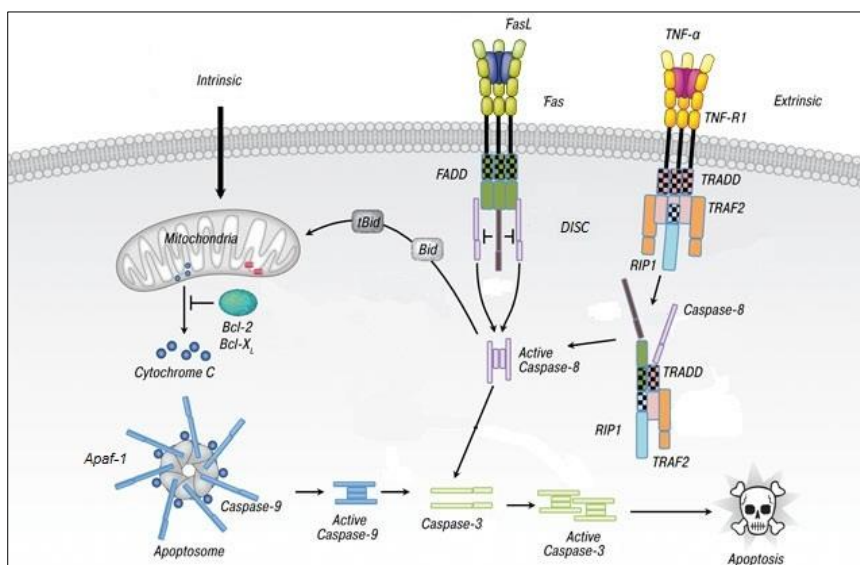
ภาพที่ 4 แสดงการเกิดปฏิกิริยาเฟนตอน (Fenton's reaction) และปฏิกิริยาฮาเบอร์-ไวส์ (Haber-Weiss reaction) ที่มีธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สำคัญ ทำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล ซึ่งมีความเป็นพิษกับเซลล์และเป็นสาเหตุของการตายของเซลล์ประสาท (รูปดัดแปลงจาก (35))

2.5 ภาวะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส คือ กระบวนการตายของเซลล์รูปแบบหนึ่งที่มีการตั้งโปรแกรมไว้ (programmed cell death) ทำให้เซลล์มีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปและนำไปสู่การตายของเซลล์ โดยเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสจะมีลักษณะจำเพาะซึ่งประกอบด้วย การหดตัวของรูปร่างเซลล์ (cell shrinkage) เส้นใยโครมาตินหดตัว (chromatin condensation) เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะ ตะปุ่ม ตะป้า (membrane blebbing) ดีเอ็นเอแตกเป็นชิ้นส่วน (DNA fragmentation) โดยกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสนั้นถูกควบคุมโดยการส่งสัญญาณของเซลล์ (cell signaling) แบ่งออกเป็น 2 ทาง ได้แก่ extrinsic pathway และ intrinsic pathway (38) (**ภาพที่ 5**)

2.5.1 Extrinsic pathway

เป็นภาวะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสที่ถูกควบคุมโดยการส่งสัญญาณจากภายนอกเซลล์ เมื่อ Fas ligand (FasL) จับกับตัวรับสัญญาณ Fas (Fas receptor) ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ จะส่งสัญญาณผ่าน Fas-associated death domain protein (FADD) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวกลางส่งสัญญาณทำให้เกิดเป็นโครงสร้างของ death-inducing signaling complex (DISC) เข้าไปทำงานร่วมกับโปรแคสเปส-8 (pro caspase-8) เพื่อกระตุ้นให้โปรแคสเปส-8 เปลี่ยนเป็นสภาวะที่พร้อมทำงาน (active caspase-8) แล้วจึงส่งสัญญาณต่อไปยังโปรแคสเปส-3 (pro caspase-3) เพื่อเปลี่ยนรูปร่างของโปรแคสเปส-3 ให้อยู่ในสภาวะที่พร้อมทำงานเช่นกัน (active caspase-3) หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส (38)



ภาพที่ 5 แสดงขั้นตอนการส่งสัญญาณของเซลล์ (cell signaling) ในกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ทั้ง extrinsic pathway และ intrinsic pathway (รูปดัดแปลงจาก (39))

2.5.2 Intrinsic pathway

เป็นภาวะที่เซลล์ตอบสนองต่อความเครียดต่างๆภายในเซลล์ เช่น ภาวะเครียดออกซิเดชัน หรือเป็นการที่เซลล์ตอบสนองต่อการกระตุ้นของโปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 (Bcl-2 family) ซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่มกระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิส (pro-apoptotic) เช่น BAX, BAK เป็นต้น และกลุ่มต้านอะพอพโทซิส (anti-apoptotic) เช่น Bcl-2, Bcl-X_L เป็นต้น ซึ่งโปรตีนทั้งสองกลุ่มนี้มีหน้าที่ในการควบคุมสมดุลของอะพอพโทซิส (40) การตอบสนองของเซลล์จากการกระตุ้นแบบ intrinsic pathway จะทำให้ศักย์ภาพของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondria membrane potential) สูญเสียความสามารถในการเลือกผ่าน และทำให้เกิดการปล่อยไซโตโครมซี (cytochrome c) ออกนอกไมโทคอนเดรียสู่บริเวณของเหลวภายในเซลล์ (cytosol) และไปจับกับ Apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1) ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างคล้ายวงล้อเรียกว่า Apoptosome ส่งสัญญาณผ่านโปรแคสเปส-9 (pro caspase-9) ให้อยู่ในรูปที่พร้อมใช้งาน (active caspase-9) และส่งสัญญาณต่อไปยังโปรแคสเปส-3 (pro caspase-3) เพื่อเปลี่ยนรูปร่าง ให้อยู่ในสภาวะที่พร้อมทำงานเช่นกัน (active caspase-3) แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส (41) กระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสนั้นมีบทบาทสำคัญในการควบคุมสมดุลของจำนวนประชากรเซลล์ (42) หากเกิดกระบวนการนี้มากเกินไป โดยเฉพาะในเซลล์ระบบประสาทและสมอง อาจนำไปสู่สาเหตุโรค Neurodegenerative disorders ได้

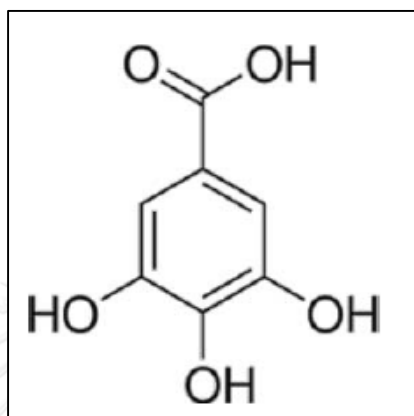
2.6 โรคจากความเสื่อมของระบบประสาท

โรคจากความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative diseases) เป็นโรคที่เกิดขึ้นจากการเสื่อมสภาพ ซึ่งจะนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาท ทำให้เกิดการสูญเสียการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) มักพบในผู้สูงอายุ อาการที่พบส่วนใหญ่คือร่างกายมีการทำงานผิดปกติไป เช่น สูญเสียความสามารถในการเรียนรู้ การจดจำ การควบคุมการเคลื่อนไหวของร่างกาย และมีอารมณ์แปรปรวน เป็นต้น ซึ่งพบได้บ่อยในโรคทางระบบประสาทหลายชนิด เช่น อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน เป็นต้น ในปัจจุบันความชุกของความเสื่อมของเซลล์ประสาท มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามอายุของประชากรทั่วโลก มีการคาดการณ์ถึงแนวโน้มจำนวนผู้ป่วยภาวะสมองเสื่อมในประเทศที่พัฒนาแล้วว่าจะเพิ่มขึ้นจาก 13.5 ล้านคน ในปี 2000 เป็น 21.2 ล้านคนในปี 2025 (43) โดยสาเหตุของการเกิดภาวะดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น ความผิดปกติทางพันธุกรรม อายุที่เพิ่มมากขึ้น รวมถึงการมีธาตุเหล็กสะสมมากขึ้นในเนื้อสมอง เช่นที่พบในผู้ป่วยสูงอายุที่ป่วยด้วยโรคอัลไซเมอร์ พาร์กินสัน Friedreich's ataxia, Huntington's disease และ Multiple sclerosis (1, 2) ในปี 1998 Lovell และคณะได้ทำการศึกษาเนื้อสมองส่วน neuropil ของผู้ป่วยอัลไซเมอร์พบว่ามีความเข้มข้นของธาตุเหล็กสะสมอยู่ $38.8 \pm 9.4 \mu\text{g/g}$ ซึ่งมากกว่าที่พบในสมองของคนปกติประมาณ 2 เท่า (44) การที่มีธาตุเหล็กสะสมอยู่ในสมองเป็นปริมาณมากอาจส่งผลให้เกิดการสร้างอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและเกิดภาวะที่เป็นพิษต่อเซลล์นำไปสู่การตายของเซลล์ในระบบประสาท ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่สำคัญในการเกิดโรคจากความเสื่อมในระบบประสาท (19)

2.7 ตรีผลา

ตรีผลา (Triphala) เป็นตำรับยาพื้นบ้านที่แพทย์แผนไทยใช้ในการรักษาโรคและการส่งเสริมสุขภาพ ตรีผลาจากคำว่าสาม ส่วนคำว่าผลานั้นหมายถึงผลไม้ ตรีผลาจึงเป็นตำรับยาที่ประกอบไปด้วยผลไม้ 3 ชนิด ได้แก่ สมอไทย (*Terminalia chebula Retz.*) (ภาพที่ 7) สมอพิเภก (*Terminalia bellerica Roxb.*) (ภาพที่ 8) และมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica L.*) (ภาพที่ 9) ซึ่งสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไป โดยปกติแพทย์แผนไทยใช้ตำรับยาตรีผลาในการดูแลส่งเสริมสุขภาพและรักษาโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร เช่น รักษาอาการท้องผูก นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากตำรับยาตรีผลามีสารสำคัญประเภทฟีนอลิก (phenolic acid) เป็นองค์ประกอบหลายชนิด เช่น gallic acid, ascorbic acid, syringic acid, epicatechin, chebulic acid, chebulagic acid และ mannitol เป็นต้น (45, 46)

กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารประกอบ phenolic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดและพบมากที่สุดในตำรับยาตรีผลา (47) โครงสร้างทางเคมีดังปรากฏตาม **ภาพที่ 6** gallic acid เป็นสารที่สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์ มีการศึกษาพบว่ากรดแกลลิกมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (48) และต้านการอักเสบ (49) นอกจากนี้ยังพบรายงานว่ากรดแกลลิกมีความสามารถในการยับยั้งการก่อตัวของ amyloid plaque สาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ที่เป็นหนึ่งในโรคความเสื่อมของระบบประสาทได้อีกด้วย (50)



ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ gallic acid (51)

นอกจากนี้ยังพบรายงานฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาในการต้านการอักเสบจากการกระตุ้นให้เกิดภาวะข้ออักเสบในหนูทดลอง (52) ลดโอกาสการติดเชื้อและช่วยในการสมานแผล (53) ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (54) เพิ่มโอกาสการรอดชีวิตของหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสีแกมมา (55) ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เป็นเบาหวาน (56) ป้องกันความเป็นพิษที่ตับและไตของหนูทดลองจากการกระตุ้นด้วยยาพาราเซตามอล (57, 58) กระตุ้นการทำงานของ neutrophil ในระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง (59) ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (60) และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (6) ซึ่งรายละเอียดของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดในตำรับยาตรีผลามีดังต่อไปนี้

2.7.1 สมอไทย



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะของผลสด (รูปซ้าย) และลักษณะผลแห้ง (รูปขวา) ของสมอไทย

(สืบค้นจาก www.thaicrudedrug.com และ www.herbalthailand.com)

สมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.) (ภาพที่ 7) มีชื่อสามัญว่า Myrobalan Wood เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ COMBRETACEAE ชื่ออื่นที่รู้จัก ได้แก่ สมออัพยา เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูงประมาณ 20-35 เมตร ลำต้นขรุขระ ใบเป็นใบเดี่ยว รูปรี เรียงตรงข้าม ดอกมีขนาดเล็กสีขาวหรือเหลืองอ่อน ออกรวมกันเป็นช่อยาว ลักษณะผลรูปทรงรี ภายในมีเมล็ดเดี่ยวแข็ง ผลสีเขียวอมเหลือง มีสัน 5 สัน (61) ในตำรายาไทยใช้ผลของสมอไทย 5-6 ผล ต้มน้ำให้เดือดและใส่เกลือเล็กน้อยรับประทานเป็นยาระบายอ่อนๆ รวมถึงใช้น้ำต้มจากผลสมอไทยกลั้วคอขับเสมหะ (62) นอกจากนี้ยังพบการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากลูกสมอไทย ดังนี้ กำจัดอนุมูลอิสระและลดการอักเสบจากภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ตับของหนูทดลอง (63-67) ด้านการอักเสบและควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดทั้งในหลอดทดลองและหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน (68-70) สมานแผลน้ำร้อนลวกในหนูทดลอง (71) ยับยั้งการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัวในหลอดทดลอง (72) ด้านการอักเสบทั้งในหลอดทดลองและหนูทดลองที่มีภาวะการอักเสบของข้อต่อ (73) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase และเอนไซม์ butyrylcholinesterase ในหลอดทดลอง (74, 75) ด้านการอักเสบระบบประสาท ด้านอนุมูลอิสระและลดการตายของเซลล์ pheochromocytoma ของหนูขาวเล็กจากการกระตุ้นด้วย OGD-R และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (76, 77) ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation จากการกระตุ้นด้วยธาตุเหล็ก (Fe^{2+}) ในสมองของหนูทดลอง (7) นอกจากนี้ยังพบว่า chebulagic acid ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญในสมอไทยยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทแบบ autophagy ได้อีกด้วย (78)

2.7.2 สมอพิเภก



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะของผลสด (รูปซ้าย) และลักษณะผลแห้ง (รูปขวา) ของสมอพิเภก

(สืบค้นจาก www.thaicrudedrug.com และ dmsc.moph.go.th)

สมอพิเภก (*Terminalia bellerica Roxb.*) (**ภาพที่ 8**) มีชื่อสามัญว่า Beleric Myrobalan เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ COMBRETACEAE ชื่ออื่นที่รู้จัก ได้แก่ ลัน, สมอแหน, แहन, แहनขาว และ แहनตัน เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ ลำต้นสูงประมาณ 25-50 เมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับ ทรงใบรูปรี ผลสดมีลักษณะทรงค่อนข้างกลมหรือกลมรี มีสันที่ผล 5 สัน ในตำรายาไทย ใช้ผลอ่อนหรือผลดิบของสมอพิเภกรับประทานเป็นยาระบาย และใช้ผลสุกบรรเทาอาการท้องเสีย (62) นอกจากนี้ยังพบการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากลูกสมอพิเภกในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบกับ DPPH ในหลอดทดลอง (79) ควบคุมระดับน้ำตาลและกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินในหลอดทดลองและในเซลล์ตับของมนุษย์ (70, 80) และมีฤทธิ์ต้านอาการซึมเศร้าในหนูทดลอง (8)

2.7.3 มะขามป้อม



ภาพที่ 9 แสดงลักษณะของผลสด (รูปซ้าย) และลักษณะผลแห้ง (รูปขวา) มะขามป้อม
(สืบค้นจาก www.pharmacy.cmu.ac.th และ frynn.com)

มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) (ภาพที่ 9) มีชื่อสามัญว่า Emblic myrobalan และ Malacca tree เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ EUPHORBIACEAE ชื่ออื่นที่รู้จัก ได้แก่ กำทวด เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ลำต้นสูงประมาณ 8-20 เมตร ใบเดี่ยว ออกเรียงสลับในระนาบเดียวกัน ปลายใบแหลม ขอบเรียบ ผลรูปกลม ผิวเกลี้ยง สีเขียวอ่อนอมเหลือง เมล็ดกลม สีเขียวเข้ม ในตำรายาไทยโบราณใช้เนื้อผลแห้งต้มน้ำเดือดรับประทานแก้ไข้ หรือใช้เนื้อผลสดของมะขามป้อมรับประทานขับเสมหะ บรรเทาอาการไอ ทำให้ชุ่มคอ หรือคั้นน้ำรับประทานแก้ท้องเสีย ขับปัสสาวะ และแก้อาการเลือดออกตามไรฟัน (62) นอกจากนี้ยังพบการศึกษาฤทธิ์จากสารสกัดจากลูกมะขามป้อมในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบกับ DPPH ในหลอดทดลอง (81) ต้านอนุมูลอิสระจากภาวะไตอักเสบเฉียบพลันที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชันในหนูทดลอง (82) ต้านการอักเสบในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอาการอ้วนทำบวม (83) ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน (84) ยับยั้งการแบ่งตัวและการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในหนูทดลอง (85, 86) ต้านอาการซึมเศร้าโดยออกฤทธิ์ควบคุมสมดุลของสารสื่อประสาท เพิ่มความจำและการเรียนรู้ในหนูทดลอง (87, 88) ต้านอนุมูลอิสระและลดภาวะเครียดออกซิเดชันจากการกระตุ้นด้วย kainic acid ให้เกิดภาวะลมชักในหนูทดลอง (89) ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation จากการกระตุ้นด้วยธาตุเหล็กในสมองของหนูทดลอง (7) ป้องกันความเสียหายของการทำงานของไมโทคอนเดรียในเซลล์สมองของหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยแอลกอฮอล์ (90) และยังพบว่าสารประกอบสำคัญในผลมะขามป้อมยังมีฤทธิ์ในการลดการตายของเซลล์ pheochromocytoma ของหนูขาวเล็กจากการกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้อีกด้วย (91)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดจากตรีผลา

สมุนไพรทั้ง 3 ชนิดจากตำรับยาตรีผลา ได้แก่ สมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.) สมอพิเภก (*Terminalia belerica* Roxb.) และมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) ทั้งแบบผลอบแห้งและแบบสดเป็นผงถูกซื้อมาจากร้านยาเวชพงศ์ไอสด (กรุงเทพฯ, ประเทศไทย) นำมาชั่งในอัตราส่วนตามที่ระบุในตำรับยา คือ 1:1:1 (น้ำหนักรวม 75 g.) และสกัดด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 250 ml. โดยแบ่งวิธีการสกัดออกเป็น 5 แบบ ดังนี้

1. ผลอบแห้งจากตำรับยาตรีผลา ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที
2. ตำรับยาตรีผลาแบบผง ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที
3. ผลอบแห้งจากตำรับยาตรีผลา ต้มและเคี้ยวจนปริมาตรของน้ำเหลือ 1 ใน 3
4. ตำรับยาตรีผลาแบบผง ต้มในน้ำอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
5. ผลอบแห้งจากตำรับยาตรีผลา ต้มในน้ำอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

(หมายเหตุ: เนื่องจากเมื่อผสมผงของสมุนไพรจากตำรับยาตรีผลากับน้ำกลั่นในปริมาณดังกล่าว ทำให้สารสกัดมีลักษณะคล้ายโคลน จึงทำให้ไม่สามารถต้มและเคี้ยวจนปริมาตรของน้ำเหลือ 1 ใน 3 ได้)

สารสกัดที่ได้ของตรีผลาทั้ง 5 แบบถูกนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge (Hettich, UK) ที่ความเร็ว 3000 RPM ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที โดยของเหลวที่ได้หลังจากการตกตะกอน (supernatant) จะถูกนำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 90 mm. (Whatman, UK) จากนั้นสารสกัดที่ได้จากการกรองจะถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dehydration; lyophilization) ด้วยเครื่องแช่แข็งแบบแห้ง หรือ Lyophilizer (Martin Christ, Germany) ผงแห้งของสารสกัดที่ได้จากกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งจะถูกเก็บใน centrifuge tubes ขนาด 15 ml (Nest Biotechnology, USA) พันฝาขวดด้วย Parafilm Tape (Bemis, USA) ในที่มืดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สารสกัดของตรีผลาทั้ง 5 แบบถูกนำมาคำนวณในรูปผลผลิตร้อยละ (percent yield) (ตารางที่ 1)

โดยคำนวณค่าผลผลิตร้อยละได้จากสมการ

$$\text{Percentage of yield} = \frac{\text{weight of plant powder extract after extraction}}{\text{weight of dried plant before extraction}} \times 100$$

ตาราง 1 แสดงผลผลิตร้อยละของสารสกัดตรีผลา

ตัวอย่าง	ค่า percent yield
1	4.68
2	5.21
3	6.92
4	7.88
5	1.49

ตัวอย่างที่ 1 คือสารสกัดจากผลอบแห้งของตำรับยาตรีผลาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที **ตัวอย่างที่ 2** คือสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาแบบผงต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที **ตัวอย่างที่ 3** คือสารสกัดจากผลอบแห้งของตำรับยาตรีผลาต้มในน้ำเดือดและเคี่ยวจนปริมาตรของน้ำเหลือ 1 ใน 3 **ตัวอย่างที่ 4** คือสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาแบบผงต้มในน้ำอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และ **ตัวอย่างที่ 5** คือผลแห้งของตำรับยาตรีผลาต้มในน้ำอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผลผลิตร้อยละ หรือ percent yield ของสารสกัดในตัวอย่างที่ 4 คือสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาแบบผงต้มในน้ำอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีจำนวนผลผลิตร้อยละในปริมาณสูงที่สุด จึงนำวิธีสกัดแบบนี้มาใช้ในการสกัดสารสกัดจากสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิดจากตำรับยาตรีผลาต่อไป

หลังจากนั้นสกัดสารสกัดจากสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิดจากตำรับยาตรีผลา ได้แก่ สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) โดยแยกสกัดสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิดแบบผงมาต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งขั้นตอนในการเตรียมทั้งก่อนและหลัง lyophilisation ทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัดจากตำรับยาตรีผลา ดังที่แสดงไว้ข้างต้น จากนั้นผงแห้งของสารสกัดเดี่ยวทั้ง 3 ชนิดของตำรับยาตรีผลา จะถูกนำมาคำนวณ percent yield (ตารางที่ 2) สารสกัดเดี่ยวของตำรับยาตรีผลาทั้ง 3 ชนิด ที่ได้จากกระบวนการ

lyophilization จะถูกเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับสารสกัดจากตำรับยาตรีผลา

ตาราง 2 แสดงผลผลิตร้อยละของสารสกัดเดี่ยวทั้ง 3 ชนิดจากตำรับยาตรีผลา ได้แก่ สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*)

ตัวอย่าง	ค่า percent yield
<i>T. Chebula</i>	3.93
<i>T. Bellerica</i>	4.68
<i>P. Emblica</i>	4.14

3.2 การวัดระดับการต้านอนุมูลไฮดรอกซิลของตรีผลาในหลอดทดลอง

ทดสอบระดับการต้านอนุมูลไฮดรอกซิลด้วยวิธีการของ Halliwell และคณะ (92) โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลที่สร้างผ่านปฏิกิริยาเพนตอนในการทำลายโมเลกุลของน้ำตาล deoxyribose โดยทำการทดลองตามลำดับ ดังนี้

1. ใส่ 120 mM phosphate buffer (Bio Basic Canada Inc., Canada) 35 μ l
2. เติม 33.6 mM deoxyribose (Sigma, USA) 35 μ l
3. เติม 1.2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (AMRESCO, USA) 35 μ l
4. เติม 300 μ M Ferric chloride (Sigma, USA) 35 μ l
5. เติม 1.2 mM Ascorbic acid (Sigma, USA) 35 μ l
6. เติมสารสกัดที่ใช้ในการทดลอง 35 μ l

โดยแบ่งความเข้มข้น ดังนี้

- สารสกัดจากตำรับยาตรีผลา ใช้ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/ml
- สารสกัดจากสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ใช้ความเข้มข้น 0.06, 0.13, 0.2, 0.26 และ 0.34 mg/ml หรือคิดเป็น 1/3 ส่วนของความเข้มข้นของสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาทั้งหมด

และเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน mannitol (Sigma, USA) ในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน

7. เติม 33.6 mM H₂O₂ (Merck, Germany) 35 µl
8. เติม dH₂O 175 µl
9. Incubate สารละลายที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
10. เติม 2.8% w/v trichloroacetic acid (Sigma, USA) 350 µl
11. เติม 1% w/v thiobarbituric acid (Sigma, USA) 350 µl
12. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวัดผลการทดลองที่เกิดขึ้น

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำลายโมเลกุลของน้ำตาล deoxyribose คือ malondialdehyde (MDA) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารละลาย thiobarbituric acid (TBA) และ trichloroacetic acid (TCA) เกิดเป็นสารละลายสีชมพู ตรวจสอบได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (BioTek Instruments, Inc, USA) และคำนวณร้อยละของการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

โดย A₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

A₁ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดลอง

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ neuroblastoma cell line (SK-N-SH) (ATCC, USA) ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด T75 (Corning, USA) ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของ Minimum Essential Medium with Earle's Balanced Salts (MEM/EBSS) (Hyclone, USA) และ 5% fetal bovine serum (FBS) (Merck Millipore, USA) ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (BINDER, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ที่ร้อยละ 5 และความชื้นร้อยละ 95-99

3.4 การทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ FAC สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา และสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยว

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท SK-N-SH บน 96-well plates (Costar®, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 4x10⁴ cells/well

3.4.1 การทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH ของ H_2O_2 โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญของเซลล์ (cell viability) จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ระดับความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 μM (93) ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ MEM/EBSS ที่ผสม FBS 1% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2 การทดสอบความเป็นพิษของ FAC

ทำการทดสอบเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษของ ferric ammonium citrate (FAC) ต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH โดยพิจารณาจาก cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ระดับความเข้มข้นของ FAC ที่ 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 $\mu g/ml$ (44) ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ MEM/EBSS ที่มีส่วนผสมของ FBS 1% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.3 การทดสอบความเป็นพิษของ FAC ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

หาระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาทของ FAC ร่วมกับ H_2O_2 โดยพิจารณาจาก cell viability จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ระดับความเข้มข้นของ FAC ที่ 100 $\mu g/ml$ และระดับความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 μM ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ MEM/EBSS ที่ผสม FBS 1% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดี่ยว

เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดจากสมุนไพรวัดเดี่ยวจากตำรับยาตรีผลา ได้แก่ สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH โดยพิจารณาจากปริมาณ cell viability ของเซลล์จากการเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดจากสมุนไพรวัดเดี่ยว สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 และ 500 $\mu g/ml$ (94) ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ MEM/EBSS ที่มีส่วนผสมของ FBS 1% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

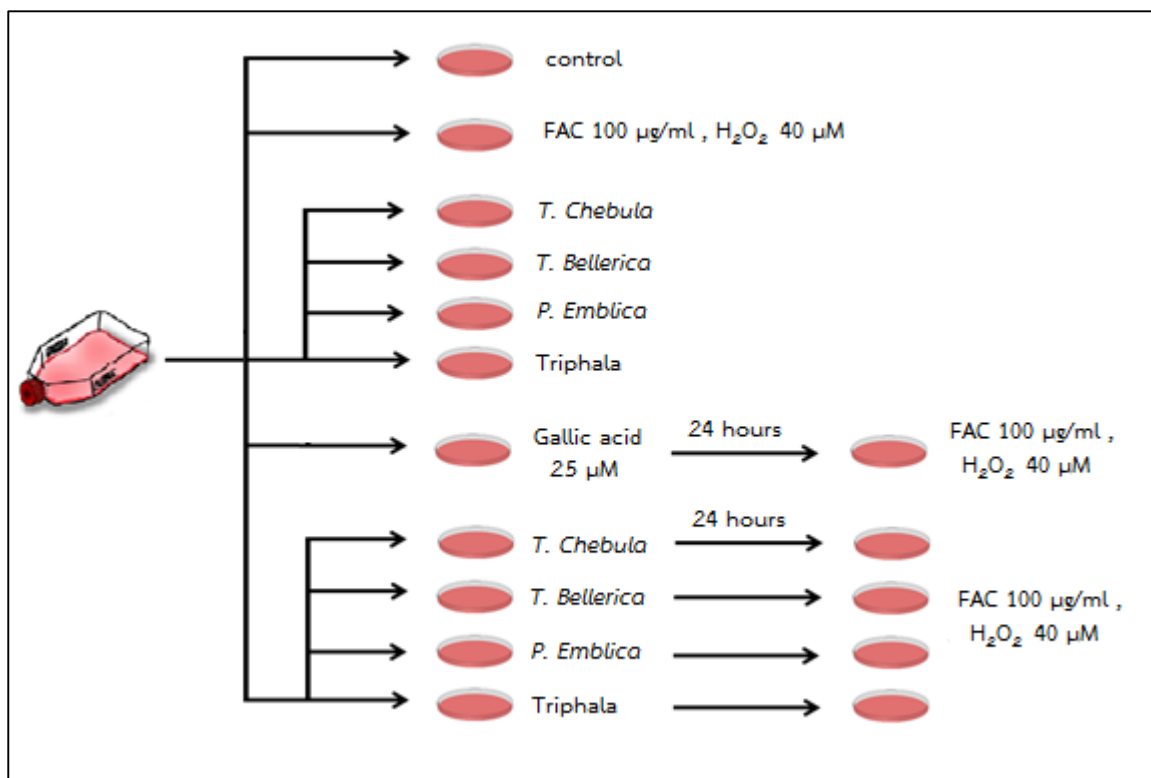
หลังจากที่เซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกเพาะเลี้ยงและกระตุ้นด้วยวิธีการดังกล่าวแล้ว จะถูกนำมาวัดและคำนวณปริมาณของ cell viability ด้วยเทคนิค MTT assay (94) โดยผสม 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA) กับอาหาร

เพาะเลี้ยงเซลล์ MEM/EBSS ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml และบ่มทิ้งไว้ในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับ CO₂ ที่ 5% และปริมาณความชื้นที่ 95-99% นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) (Bio Basic Canada Inc., Canada) ในปริมาตร 75 µl/well และเขย่าด้วยความแรงระดับต่ำด้วยเครื่อง microplate reader เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณ cell viability โดยวัดจากสภาวะ reduction environment ในเซลล์ เมื่อ MTT ถูก reduced ด้วย เอนไซม์ *dehydrogenase* จะทำให้สีของ MTT เปลี่ยนเป็นสีม่วงของ formazan โดยสีจะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (nanometres) โดยใช้เครื่อง microplate reader

3.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียว

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท SK-N-SH ใน 96-well plates เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 4x10⁴ cells/well โดยการทดลองในครั้งนี้จะแบ่งเซลล์ออกเป็น 5 กลุ่ม (ภาพที่ 10) คือ

1. กลุ่มควบคุม (untreated)
2. กลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC ความเข้มข้น 100 µg/ml และ H₂O₂ ความเข้มข้น 40 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. กลุ่มที่กระตุ้นด้วยสารสกัดจากสมุนไพรวัดเดียวเพียงอย่างเดียว คือ ตรีผลา ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml และสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ระดับความเข้มข้น 16.7 และ 33.4 µg/ml (คิดเป็น 1/3 ส่วนของความเข้มข้นของสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาทั้งหมด) เวลา 24 ชั่วโมง
4. กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกรดแกลลิก (gallic acid) (Sigma, USA) ความเข้มข้น 25 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นด้วย FAC ความเข้มข้น 100 µg/ml และ H₂O₂ ความเข้มข้น 40 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. กลุ่มที่กระตุ้นด้วยสารสกัดจากสมุนไพรวัดเดียว คือ ตรีผลา ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml และสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ระดับความเข้มข้น 16.7 และ 33.4 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกระตุ้นด้วย FAC ความเข้มข้น 100 µg/ml และ H₂O₂ ความเข้มข้น 40 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 10 แสดงกลุ่มการทดลองในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH ของสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดจากสมุนไพรเดี่ยวจากตำรับยาตรีผลา

หลังจากที่เซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกเพาะเลี้ยงและกระตุ้นด้วยวิธีการดังกล่าวแล้ว เซลล์จะถูกนำมาวัดและคำนวณปริมาณของ cell viability ด้วยเทคนิค MTT assay ตามวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้วในข้อ 3.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.6 การวัดระดับของธาตุเหล็กภายในเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท SK-N-SH ใน 96-well plates (black plate clear bottom) (Costar, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 4×10^4 cells/well เซลล์ประสาท SK-N-SH จะถูกกระตุ้นโดยแบ่งกลุ่มการทดลองตามที่ได้อธิบายไปแล้วในข้อ 3.5 (ภาพที่ 10) หลังจากนั้นระดับเหล็ก (Fe^{2+}) จะถูกทดสอบด้วยเทคนิค calcein AM

โดยผสม calcein (Invitrogen, USA) กับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ MEM/EBSS ในความเข้มข้น $1 \mu M$ ในปริมาตร $100 \mu l/well$ และบ่มทิ้งไว้ในที่มีดในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับ CO_2 ที่ 5% และปริมาณความชื้นที่ $95-99\%$ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS buffer (Bio Basic Canada Inc., Canada) 2 ครั้ง และใส่ PBS buffer ในปริมาตร $100 \mu l/well$ ก่อนนำไปวัดค่าการสะสมของเหล็กภายในเซลล์ โดย calcein AM จะผ่าน cell membrane เข้าไปจับกับเหล็ก (Fe^{2+}) ในรูปของ free form ภายในเซลล์ ส่วนที่ไม่ได้จับกับธาตุ

เหล็กจะถูก intracellular esterases ดึงเอา acetomethoxy group ออกจึงสามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ได้ ปริมาณของธาตุเหล็กในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจะถูกคำนวณจากค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่ลดลง โดยวัดค่าการดูดกลืน (excitation) และปล่อยพลังงาน (emission) ที่ความยาวคลื่น 495 และ 515 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้เครื่อง microplate reader

3.7 การวัดระดับ Reactive Oxygen Species

เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท SK-N-SH ใน 96-well plates ชนิด black plate clear bottom โดยให้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 4×10^4 cells/well เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ประสาท SK-N-SH จะถูกกระตุ้นโดยแบ่งกลุ่มการทดลองตามที่ได้อธิบายไปแล้วในข้อ 3.5 (ภาพที่ 10)

ระดับของ ROS ภายในเซลล์จะถูกวัดด้วย 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate, acetylesther (CM-H₂DCFDA) (Cell Biolab, USA) ทำการบ่ม CM-H₂DCFDA probe ก่อนการกระตุ้นเซลล์ 24 ชั่วโมงสุดท้ายของการทดลอง วิธีการบ่มทำโดยการเติม DMSO ปริมาตร 8.6 μ l เข้าไปผสมกับ CM-H₂DCFDA เพื่อปรับความเข้มข้นให้เป็น 10 mM แล้วจึงผสมกับ 1X PBS ในปริมาตร 100 μ l/well และบ่มทิ้งไว้ในที่มืดในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นสารละลายจะถูกดูดออกทั้งหมด แล้วเติม condition media ตามปกติและบ่มทิ้งไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนจะนำไปวัดระดับ ROS ภายในเซลล์ โดย CM-H₂DCFDA จะผ่าน cell membrane เมื่อมีระดับ ROS อยู่ภายในเซลล์ CM-H₂DCFDA จะถูกเปลี่ยนเป็น 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) ซึ่งสามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ได้ ระดับของ ROS จะถูกวัดจากปริมาณของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้ โดยวัดค่าการดูดกลืนและปล่อยพลังงานที่ความยาวคลื่น 495 และ 525 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้เครื่อง microplate reader

3.8 การสกัดและวัดปริมาณโปรตีน

เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท SK-N-SH ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด T75 (Corning®, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 7.5×10^6 cells เซลล์จะถูกกระตุ้นโดยแบ่งกลุ่มการทดลองตามที่ได้อธิบายไปแล้วในข้อ 3.5 (ภาพที่ 10) แล้วทำการเก็บ pellet ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

วิธีการวัด โดยทำให้เซลล์แตก (break cell) ด้วยเครื่อง sonicator (VIRTIS COMPANY, INC., USA) จากนั้นนำ supernatant ที่ได้มาวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ bicinchoninic acid (BCA) assay kits (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) โดยผสม reagent

A (ประกอบด้วย sodium carbonate, sodium bicarbonate, bicinchoninic acid และ sodium tartrate ใน 0.1M sodium hydroxide) ปริมาตร 196 $\mu\text{L}/\text{well}$ กับ reagent B (ประกอบด้วย 4% cupric sulfate) ปริมาตร 4 $\mu\text{L}/\text{well}$ และผสม supernatant ในแต่ละกลุ่มการทดลอง ปริมาตร 5 $\mu\text{L}/\text{well}$ บ่มทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีน โดยวัดจากสถานะที่โปรตีนในสารละลายทำปฏิกิริยากับ bicinchoninic acid ซึ่ง Cu^{2+} จะถูกรีดิวซ์กลายเป็น Cu^+ และจะทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินม่วง โดยความเข้มของสีจะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader

3.9 การวัดระดับโปรตีนคาร์บอนิล

หลังจากสกัดและวัดความเข้มข้นของโปรตีนแล้ว ทำการวัดระดับของโปรตีนคาร์บอนิลในเซลล์ SK-N-SH โดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาของ 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) กับหมู่คาร์บอนิลของโปรตีน (protein CO group) จะได้ 2,4-dinitrophenyl (DNP) ซึ่งเป็นสารที่เสถียร และสามารถคำนวณปริมาณของโปรตีนคาร์บอนิลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง การทดลองเริ่มจากใช้โปรตีนความเข้มข้น 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เติมลงใน 10 mM DNPH (Sigma, USA) ที่ผสมใน 2N hydrochloric acid (HCl) (Merck, Germany) ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml (Eppendorf, Germany) โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 250 μL และใช้โปรตีนในระดับความเข้มข้นเดียวกัน ผสมกับ 2N HCl เป็น negative control บ่มทิ้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที โดยนำออกมาเขย่าทุกๆ 10 นาที จากนั้นเติม 20% trichloroacetic acid (TCA) (Sigma, USA) ปริมาตร 250 μL และบ่มต่อในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 RCF อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ซึ่งจะทำให้เห็นตะกอนอยู่บริเวณก้นของหลอดทดลอง จากนั้นเท supernatant ทิ้ง แล้วเติม 1:1 v/v ethanol/ethyl acetate (Sigma, USA) 500 μL แล้วนำไป centrifuge อีกครั้ง ที่ความเร็ว 10,000 RCF อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเท supernatant ทิ้งแล้วเติม 6M guanidine hydrochloride (GdmCl) (Sigma, USA) ที่ผสมอยู่กับ 0.5M Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Bio Basic Canada Inc., Canada) ปริมาตร 250 μL จากนั้นให้ความร้อนสารละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อละลายตะกอนทั้งหมดและวัดผลการทดลองที่เกิดขึ้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader

3.10 การสกัดอาร์เอ็นเอ

เตรียมการสกัด RNA โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท SK-N-SH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 2.5×10^6 cells เซลล์ประสาท SK-N-SH จะถูกกระตุ้นโดยแบ่งกลุ่มการทดลองตามที่ได้อธิบายไปแล้วในข้อ 3.5 (ภาพที่ 10) หลังจากนั้นนำเซลล์ประสาทที่ได้จากการทดลองดังกล่าวมาสกัด RNA ตามวิธีการของ Choi และคณะ (95) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของ Trizol reagent ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และแยกองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ เช่น RNA, DNA และโปรตีน โดยเติม Trizol (GeneMark Bio, Taiwan) ปริมาตร 1 ml และ incubate ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นถ่าย trizol จากภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด T25 มาไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml (Eppendorf, Germany) เติม chloroform (Sigma, USA) ปริมาตร 200 μ l แล้วนำไป vortex 15 วินาที ให้สารละลายทั้งหมดเข้ากันดี จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของสารละลาย แล้วจึงนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 RCF อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ซึ่งจะทำให้เห็นการแยกชั้นของสารละลายออกเป็น 3 ส่วน โดยส่วนใสที่อยู่บนสุดคือ RNA หลังจากนั้นดูดสารละลายใสส่วนบนสุดออกมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วเติม isopropanol (Merck Millipore, USA) ปริมาตร 500 μ l แล้วจึงนำไปเก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 12-14 ชั่วโมง) หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 RCF อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จะเห็น pellet เป็นตะกอนเล็กๆ อยู่ตรงก้นของหลอดทดลอง จากนั้นเท isopropanol ทิ้ง แล้วเติม 75% ethanol (Merck, Germany) ปริมาตร 500 μ l ผสมให้ละลายอย่างเบามือ ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วจึงนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 7,500 RCF อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ก่อนที่จะเท ethanol ทิ้งและวาง pellet พักไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง แล้วจึงเติม RNase free water 40 μ l เพื่อละลาย pellet และหลังจากนั้นจึงนำไปวัดปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) และปรับความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดให้เป็น 1 μ g/ μ l เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.11 การสังเคราะห์ cDNA

การสังเคราะห์ complementary DNA หรือ cDNA นั้นทำโดยผ่านกระบวนการ RT-PCR ในการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยเริ่มต้นจากการเตรียม master mix (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ปริมาตรรวม 20 μ l ที่ประกอบไปด้วย 5X Reaction Buffer ปริมาตร 4 μ l, 10 mM dNTP Mix ปริมาตร 2 μ l, 100 μ M Oligo(dT)₁₈ Primer ปริมาตร 1 μ l, RiboLock RNase Inhibitor ปริมาตร 1 μ l, RevertAid RT ปริมาตร 1 μ l, nuclease free water ปริมาตร 9 μ l และ

template RNA 1 μg โดยสารทั้งหมดจะถูกผสมกันใน microtube ขนาด 0.1 ml (Eppendorf, Germany) หลังจากจึงนำไปเข้าสู่กระบวนการ PCR ด้วยเครื่อง thermal cycling (BioTek Instruments, Inc., USA) เพื่อสังเคราะห์ cDNA หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการทั้งหมดแล้ว cDNA จะถูกเก็บอยู่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.12 การวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ด้วยเทคนิค real time PCR

หลังจากที่สังเคราะห์ cDNA แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณของการแสดงออกในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค real time polymerase chain reaction หรือ real time PCR ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA ในตำแหน่งที่ต้องการ ในการทดลองครั้งนี้จะวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ ได้แก่ caspase3, Bax, และ Bcl-2 และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ ได้แก่ catalase (CAT), superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) โดยมี β -actin เป็น internal control โดย sequence ของ primer ตามที่แสดงในตาราง 3

ขั้นตอนการทดลองเริ่มต้นด้วยการเตรียม SYBR Green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ปริมาตรรวม 10 μl โดยใช้ 2X maxima SYBR Green ปริมาตร 5 μl , 2 μM forward primers, reverse primers (IDT, USA), 1000 ng DNA template และ nuclease free water ปริมาตร 2 μl (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) โดยส่วนประกอบทั้งหมดจะถูกผสมใน microtube ขนาด 0.1 ml (Eppendorf, Germany) ก่อนจะเข้าสู่การทำ PCR ด้วยเครื่อง real time thermocycler (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

Condition real time PCR

- Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- Annealing ที่อุณหภูมิต่างๆ ตาม ชนิดของ primer ที่แสดงในตารางที่ 3.3 เป็นเวลา 30 วินาที
- Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
โดยใช้จำนวนการทำปฏิกิริยา 40 รอบ

3.13 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทำโดยใช้โปรแกรม SPSS 22.0 ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ ปริมาณ cell viability ระดับโปรตีน และระดับการแสดงออกของยีน นำเสนอด้วยค่าเฉลี่ย (Mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM : standard error of mean) การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มเปรียบเทียบด้วยสถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) นำเสนอความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ Tukey โดยค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติประเมินที่ความเชื่อมั่น p -value น้อยกว่า 0.05

ตาราง 3 แสดงไพรเมอร์จำเพาะ (specific primers) ที่นำมาใช้ในการวัดระดับการแสดงออกของยีน catalase (CAT), superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1), caspase3, Bax และ Bcl-2 ด้วยวิธี real time PCR

Gene	Sequence 5'→ 3'	Annealing Temp.	PCR product Size (bp)
β -Actin	Forward primer : ACTCTTCCAGCCTTCCTTC Reverse primer : ATCTCCTTCTGCATCCTGTC	55°C	171
CAT	Forward primer: TGGAGCTGGTAACCCAGTAG Reverse primer: CCTTTGCCTTGGAGTATTTGG	55°C	209
SOD1	Forward primer: GGTGGGCCAAAGGATGAAGA Reverse primer : CCACAAGCCAAACGACTTCC	52°C	227
GPx1	Forward primer: CAGTCGGTGTATGCCTTCTCG Reverse primer : GAGGGACGCCACATTCTCG	56°C	105
Bax	Forward primer : AACATGGAGCTGCAGAGGAT Reverse primer : CAGCCCATGATGGTTCTGAT	57°C	200
Bcl-2	Forward primer: CGGTTCAAGTACTCAGTCATC Reverse primer : GGTGGGGTCATGTGTGTGG	57°C	89
Caspase-3	Forward primer: GAAATTGTGGAATTGATGCGT Reverse primer: CTACAACGATCCCCTCTGAAA	55°C	164

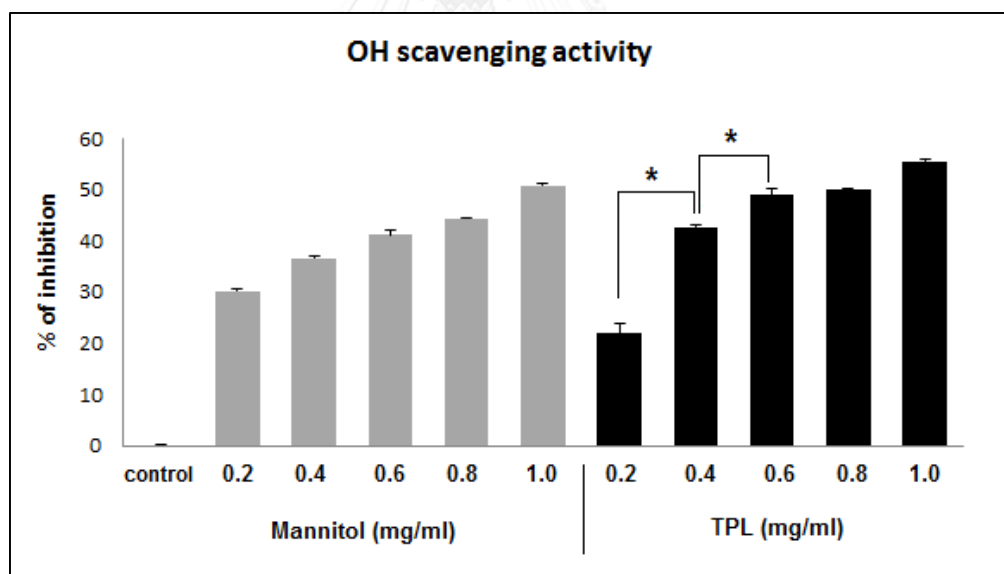
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวและจากตำรับยาตรีผลาในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล

4.1.1 ฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล

เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล ที่เกิดจากปฏิกิริยา Fenton reaction ของน้ำตาล deoxyribose ในการทดลอง โดยใช้ mannitol เป็นสารละลายมาตรฐานประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา ในระดับความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/ml ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของตำรับ โดยค่าความเข้มข้นในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลร้อยละ 50 (50% inhibition) ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ได้จากการทดสอบ คือ 0.812 mg/ml (ภาพที่ 11)

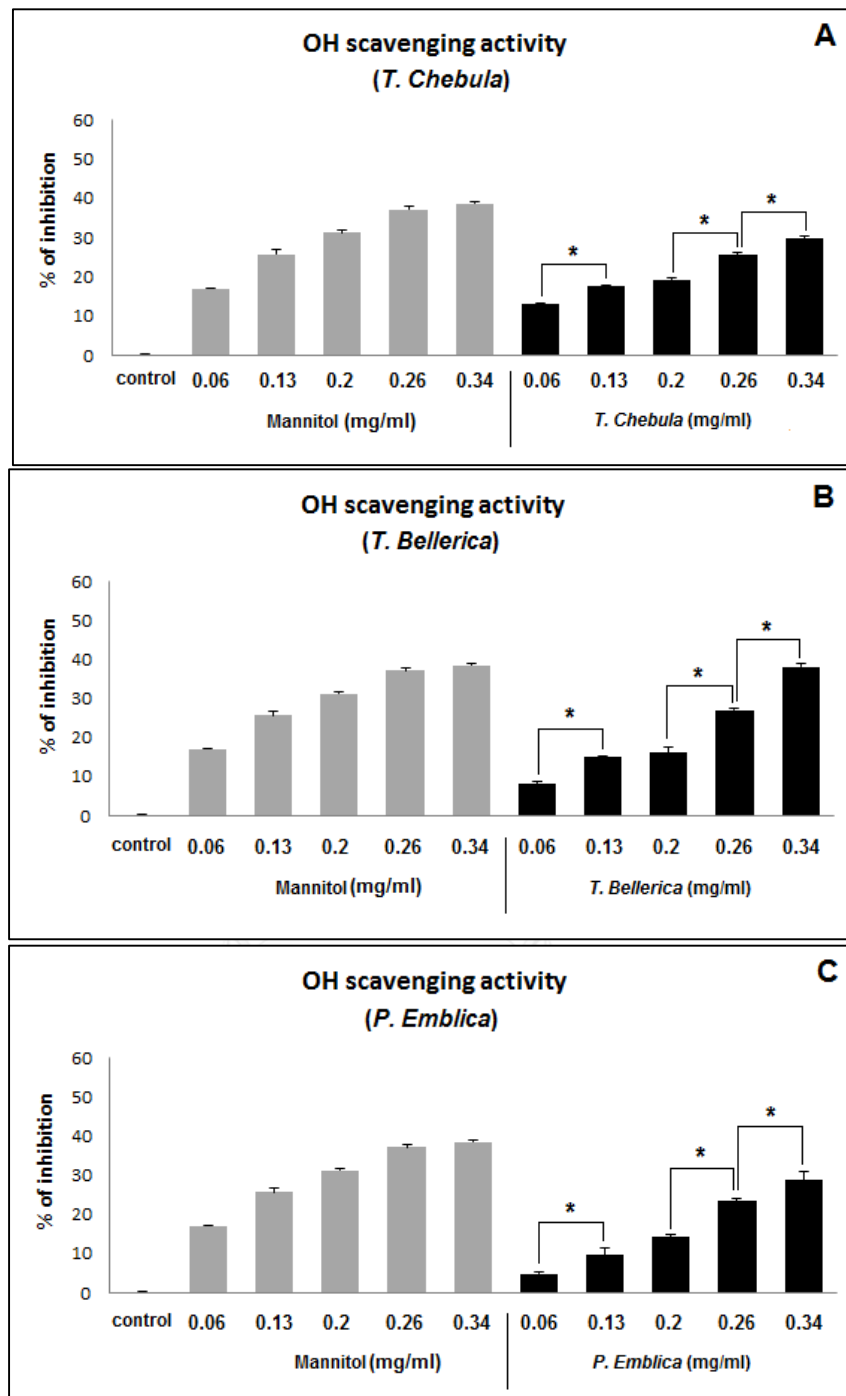


ภาพที่ 11 แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิล (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$

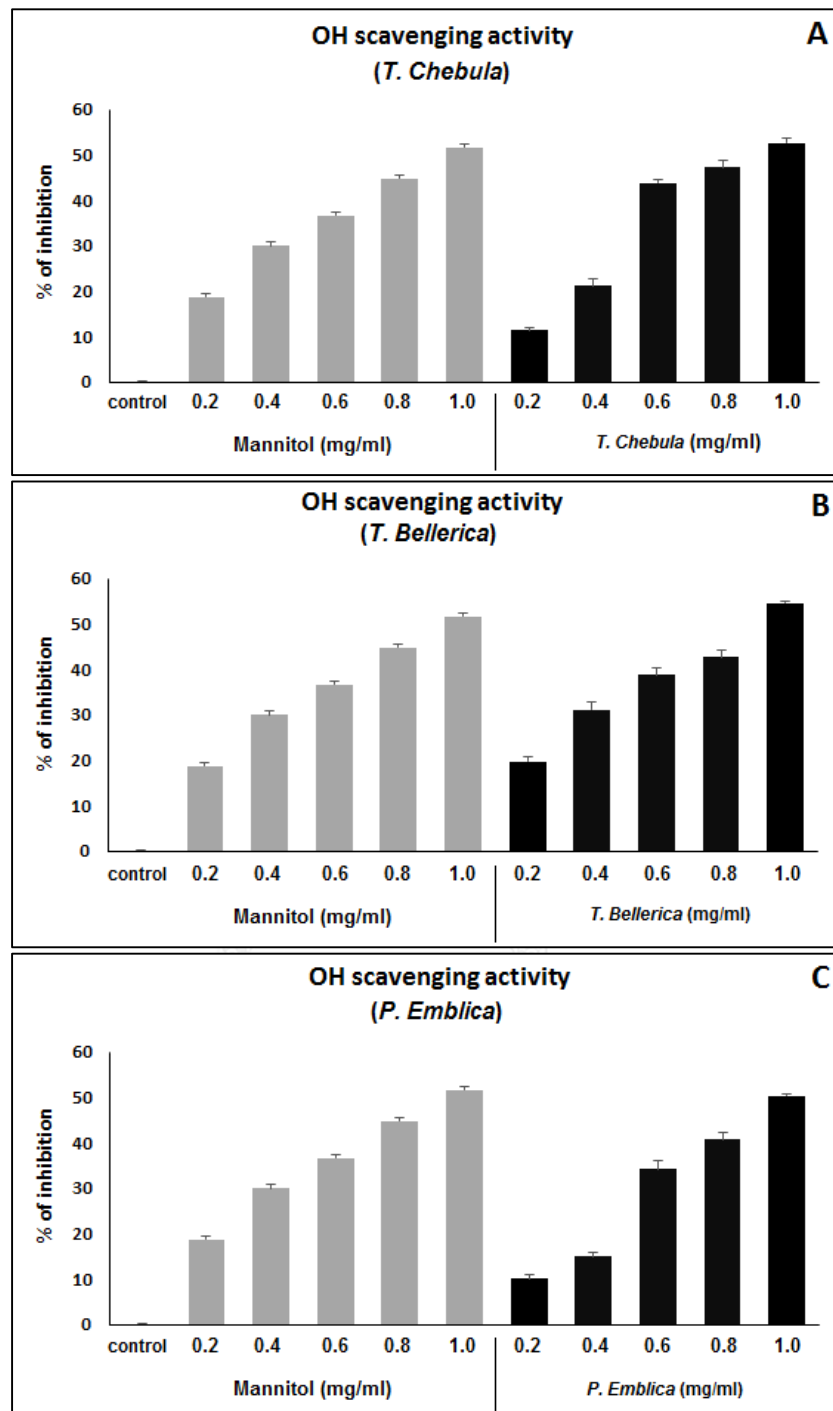
4.1.2 ฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดี่ยวในตำรับยาตรีผลาในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล

เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดี่ยวในตำรับยาตรีผลาทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) กับสารละลาย mannitol ในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน ได้แก่ 0.06, 0.13, 0.2, 0.26 และ 0.34 mg/ml ซึ่งเทียบเท่ากับ 1 ใน 3 ตามสัดส่วนที่เป็นองค์ประกอบในตำรับยาตรีผลาที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็น สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลได้มากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดี่ยวและตำรับยาตรีผลา พบว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดี่ยวทั้งสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ความเข้มข้น 0.06, 0.13 และ 0.2 mg/ml มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลคิดเป็นร้อยละ 30 (โดยประมาณ) เมื่อเทียบกับสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 0.6 mg/ml ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดี่ยวที่ความเข้มข้น 0.26 และ 0.34 mg/ml พบว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดี่ยวทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลได้มากขึ้น โดยคิดเป็นร้อยละ 50 (โดยประมาณ) เมื่อเทียบกับสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ความเข้มข้น 0.8 และ 1.0 mg/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 12A-C) อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 0.06, 0.13, 0.2, 0.26 และ 0.34 mg/ml ยังไม่เพียงพอที่จะทดสอบค่า 50% inhibition ของสารสกัดจากสมุนไพรวัดเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด ผู้วิจัยจึงเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากสมุนไพรวัดเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด เป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/ml โดยพบค่า 50% inhibition ของสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) มะขามป้อม (*P. Emblica*) และ mannitol คือ 0.945, 0.915, 0.994 และ 0.983 mg/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 13A-C) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลได้น้อยกว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา (50% inhibition = 0.812 mg/ml)



ภาพที่ 12 แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว

A. แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) B. แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) C. แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากมะขามป้อม (*P. Emblica*) เทียบกับสารละลาย mannitol ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิล (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย $*p < 0.05$



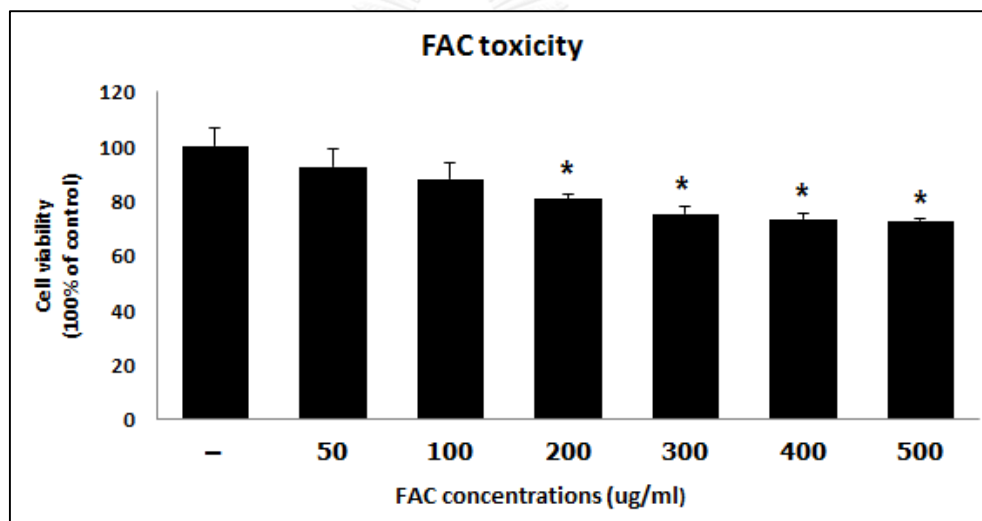
ภาพที่ 13 แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยว

A. แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) B. แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) C. แสดงผลการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากมะขามป้อม (*P. Emblica*) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิล (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM)

4.2 ระดับความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ธาตุเหล็ก (FAC) สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวในตำรับยาตรีผลาต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH

4.2.1 ความเป็นพิษของธาตุเหล็กต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH

ทดสอบการรอดชีวิต (cell viability) ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ที่ความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ด้วยเทคนิค MTT assay ผลการทดลองพบว่า cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม แต่ในกลุ่มของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยธาตุเหล็กที่ความเข้มข้น 200, 300, 400 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ มีปริมาณ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า FAC ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH ในการทดลองครั้งนี้ (ภาพที่ 14)

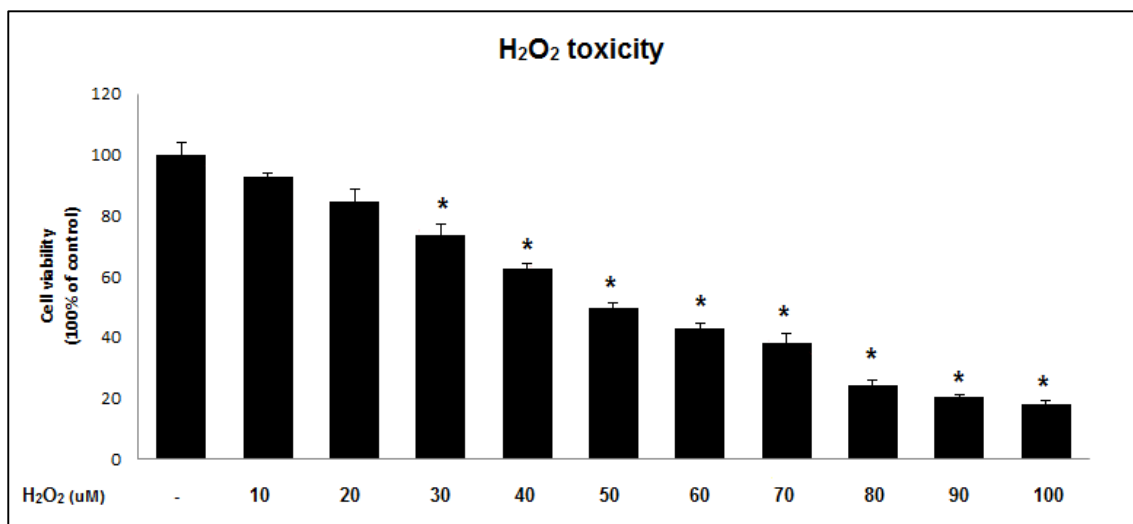


ภาพที่ 14 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย $*p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.2.2 ความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH

ผลการทดลอง cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 μM พบว่า cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 μM ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม แต่ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ที่ระดับความเข้มข้น 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 μM มีปริมาณ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่า 50% Lethal dose (LD_{50}) อยู่ที่ 57.39 μM (ภาพที่ 15)

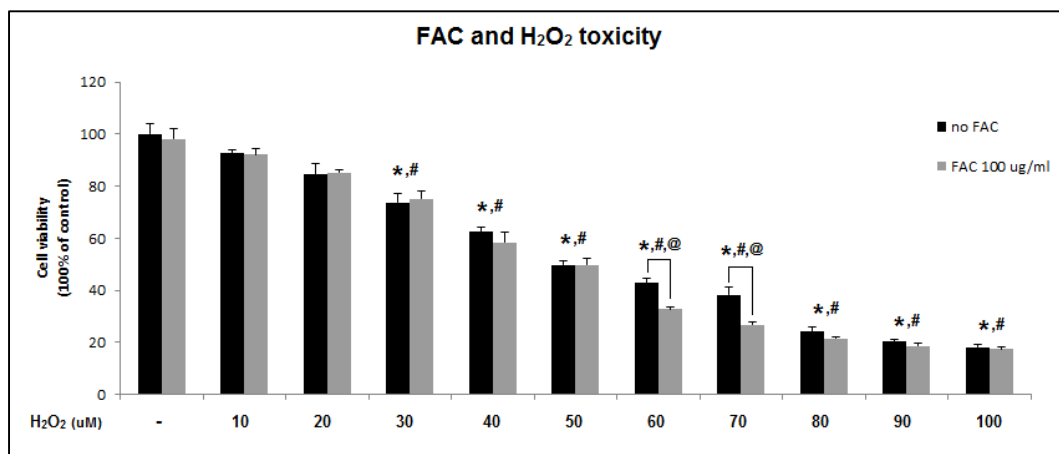


ภาพที่ 15 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂

กราฟข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.2.3 ความเป็นพิษของธาตุเหล็กร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH

ในการทดสอบความเป็นพิษของ FAC ร่วมกับ H₂O₂ ต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH โดยใช้ FAC ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ได้ทดสอบแล้วว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH ร่วมกับ H₂O₂ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 - 100 µM ผลการทดลองพบว่า ปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC 100 µg/ml ร่วมกับ H₂O₂ ที่ 10 และ 20 µM ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใส่ FAC เพียงอย่างเดียว ในขณะที่กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC 100 µg/ml ร่วมกับ H₂O₂ ที่ 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 µM ปริมาณ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใส่ FAC เพียงอย่างเดียว (**ภาพที่ 16**) อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณ cell viability ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 60 และ 70 µM มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มเซลล์ที่มีระดับความเข้มข้นของ H₂O₂ ที่เท่ากัน ค่า LD₅₀ ของเซลล์ประสาทกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H₂O₂ เท่ากับ 50.17 µM ซึ่งมีความเป็นพิษกับเซลล์ประสาท SK-N-SH มากกว่าการใช้ H₂O₂ กระตุ้นเพียงอย่างเดียว (LD₅₀ = 57.39 µM)

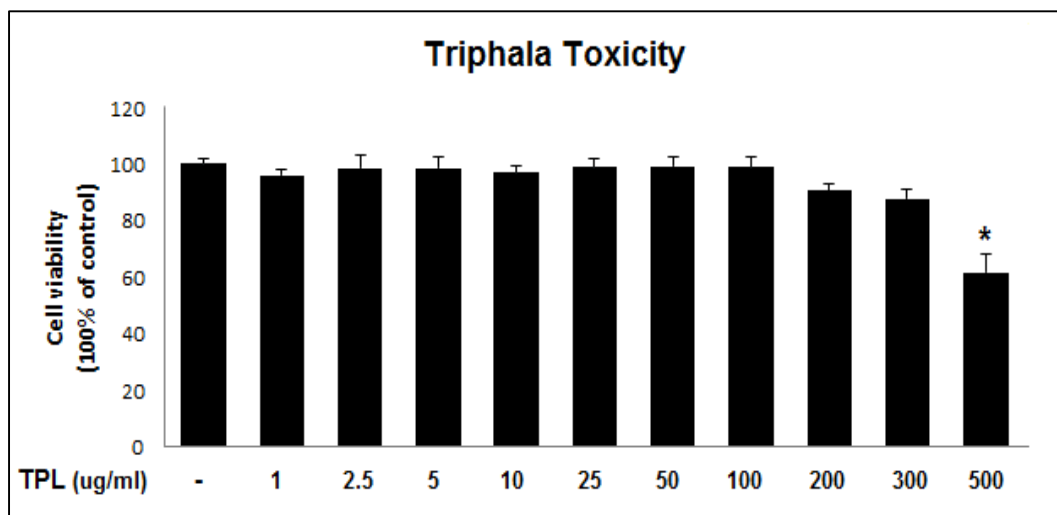


ภาพที่ 16 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC และ H₂O₂

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วยธาตุเหล็กเพียงอย่างเดียว และ @ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นร่วมกับธาตุเหล็กในความเข้มข้นของ H₂O₂ ที่เท่ากัน

4.2.4 ความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH

เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ปลอดภัยกับเซลล์ประสาท SK-N-SH เซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากตรีผลาที่ระดับความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 และ 500 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่ระดับ cell viability จะถูกตรวจสอบโดยใช้เทคนิค MTT assay ผลการทดลองพบว่า ปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ทุกระดับความเข้มข้นยกเว้น 500 µg/ml ไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในทางกลับกันเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่กระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ระดับความเข้มข้น 500 µg/ml มีปริมาณ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ 50 และ 100 µg/ml เป็น 2 ความเข้มข้นสูงสุดที่มีจำนวนร้อยละของ cell viability ใกล้เคียงร้อยละ 100 ซึ่งไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ส่วนความเข้มข้นที่ 200 และ 300 µg/ml เซลล์มีการตายเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มความเข้มข้นที่ 50 และ 100 µg/ml (ภาพที่ 17) นอกจากนี้การใช้ความเข้มข้นที่สูงแต่ไม่มีความแตกต่างกับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า จะเป็นการสิ้นเปลืองสารทดสอบโดยไม่จำเป็น ด้วยเหตุนี้ในการศึกษาวิจัยต่อไป จึงใช้ความเข้มข้นของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ 50 และ 100 µg/ml (ภาพที่ 17)

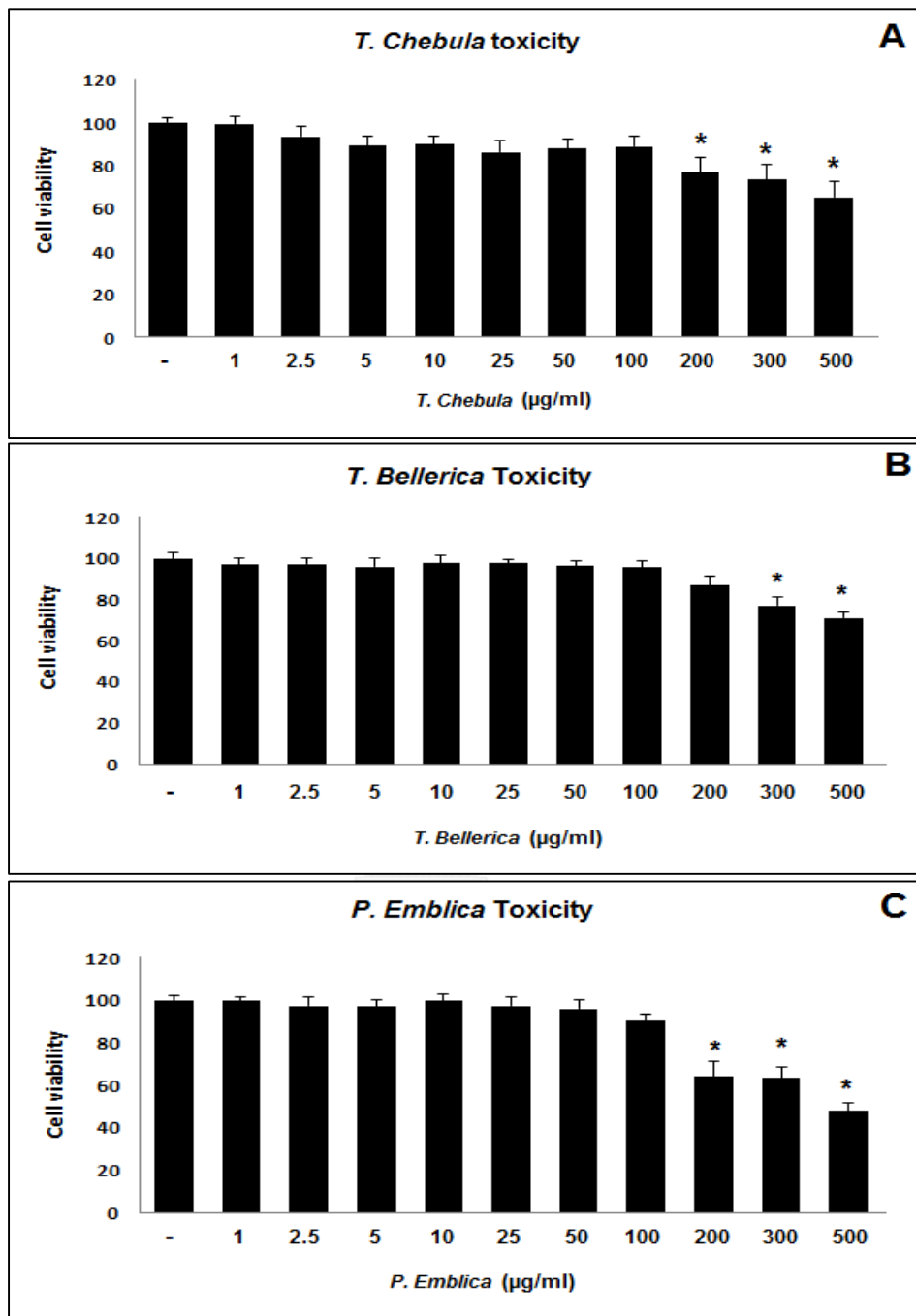


ภาพที่ 17 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.2.5 ความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH

เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดต่อเซลล์ประสาทที่ปลอดภัยกับเซลล์ประสาท SK-N-SH เซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาวัดปริมาณ cell viability โดยใช้เทคนิค MTT assay ผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ระดับความเข้มข้น 200, 300 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ และเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) ที่ระดับความเข้มข้น 300 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ มีปริมาณ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 18A-C) และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาพบว่า สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีความเป็นพิษกับเซลล์ประสาท SK-N-SH ต่ำกว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัด เนื่องจากปริมาณ cell viability ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาอยู่ที่ 500 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดทั้ง 3 ชนิด

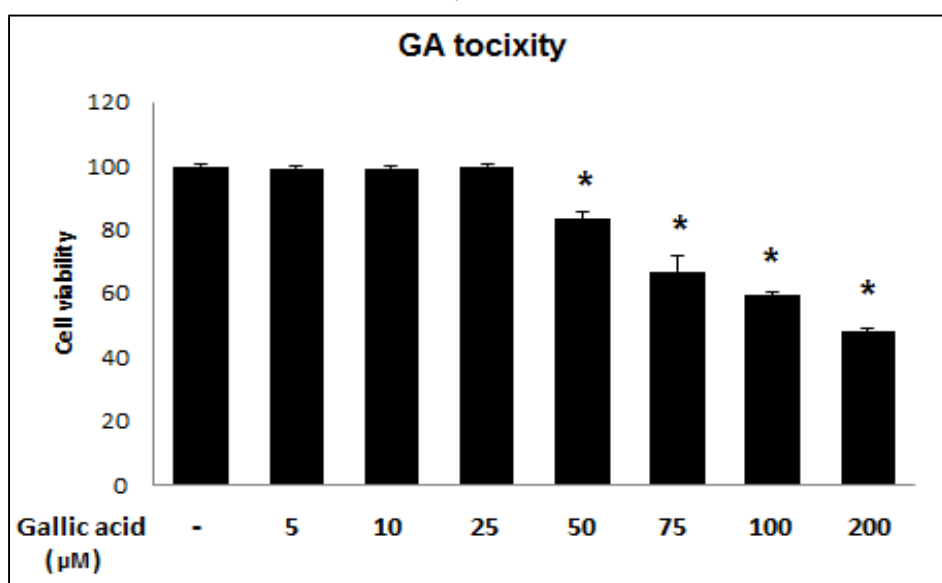


ภาพที่ 18 แสดง cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยว

A. แสดง cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) B. cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) C. cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากมะขามป้อม (*P. Emblica*) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.2.6 ความเป็นพิษของ gallic acid ต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH

เพื่อทดสอบระดับความเป็นพิษของ gallic acid ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบหลักในสารสกัดน้ำจากสมุนไพรรังทั้ง 3 ชนิดในตำรับยาตรีผลา โดยจะนำ gallic acid มาใช้เป็น positive control ในการทดลองต่อไป ในการทดลองเซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกกระตุ้นด้วย gallic acid ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, 75, 100 และ 200 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และคำนวณ cell viability โดยใช้เทคนิค MTT assay ผลการทดลองพบว่า ปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย gallic acid ที่ 50, 75, 100 และ 200 μM มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 19) โดยมีค่า LD_{50} อยู่ที่ 84.07 μM จากผลการทดลองจึงเลือกใช้ gallic acid ในความเข้มข้น 25 μM เพื่อใช้เป็น positive control ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 19 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย gallic acid

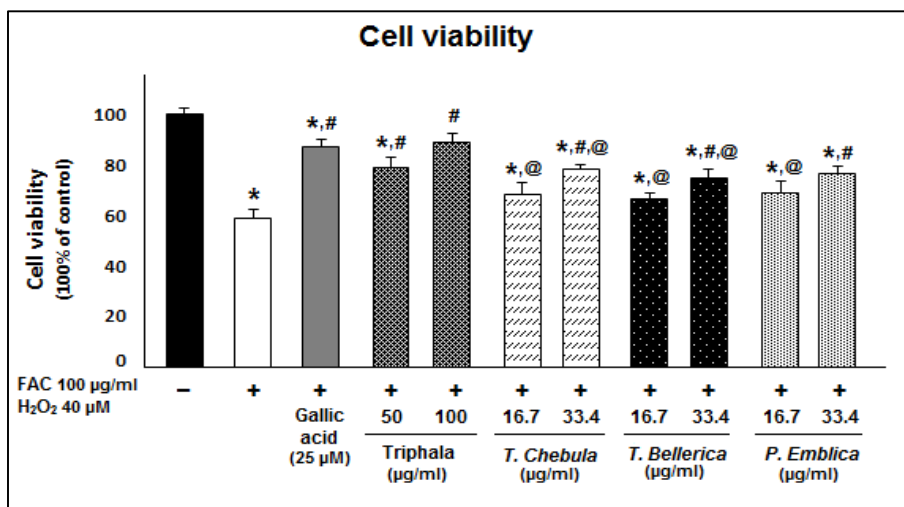
ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.3 ผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH

เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH จากความเป็นพิษของ FAC ร่วมกับ H_2O_2 ในการทดลองเซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ หรือสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวทั้ง 3 ชนิด สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ระดับความเข้มข้น 16.7 และ 33.4 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 40 μM ร่วมกับ FAC 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย gallic acid เป็น positive control จากนั้นใช้เทคนิค MTT assay ในการตรวจสอบปริมาณ cell viability

ผลการทดลองพบว่า เซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 มีปริมาณ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ pretreatment ด้วย gallic acid สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาทั้งสองความเข้มข้น สารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ มีปริมาณ cell viability เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเซลล์ประสาท SK-N-SH กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC กับ H_2O_2 เพียงอย่างเดียว

และเมื่อ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) กับสมอพิเภก (*T. Bellerica*) ที่ความเข้มข้น 16.7 และ 33.4 $\mu\text{g/ml}$ และมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า มีปริมาณ cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ gallic acid ซึ่งเป็น positive control ในขณะที่ฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาทั้งสองความเข้มข้น และสารสกัดจากมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH ไม่แตกต่างจาก gallic acid (ภาพที่ 20) แม้ว่าฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพสูงสุดในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH โดยพบปริมาณ cell viability ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 20 แสดงปริมาณ cell viability ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดก่อนถูกกระตุ้นด้วย FAC กับ H₂O₂

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้น FAC กับ H₂O₂ และ @ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid

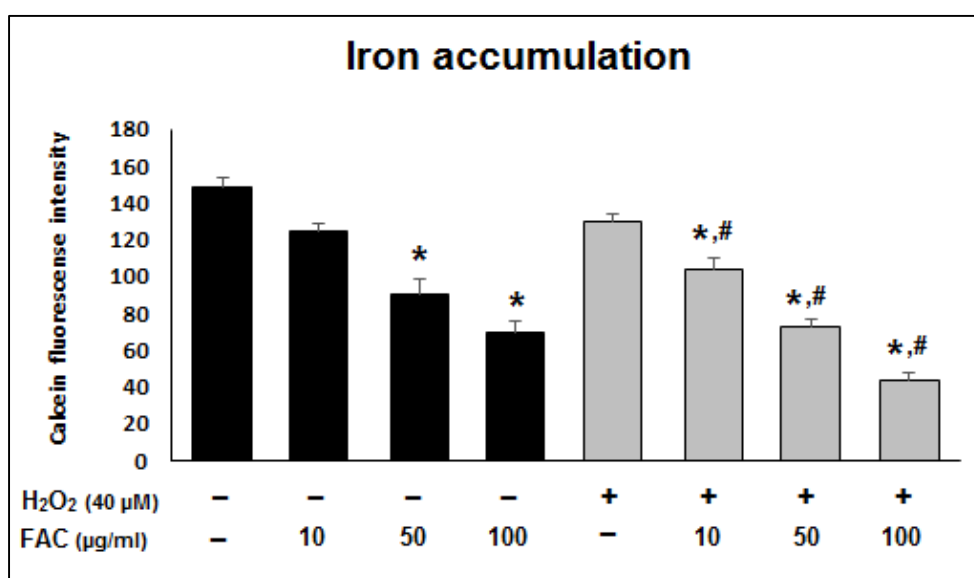
4.4 ผลของระดับธาตุเหล็กที่สะสมภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH

เพื่อยืนยันการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH ปริมาณเหล็กที่สะสมภายในเซลล์ถูกตรวจสอบโดยเทคนิค calcein AM โดยวัดจากความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งออกมา แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งออกมามากแสดงถึงปริมาณของธาตุเหล็กที่สะสมในเซลล์น้อย ในการทดลองเซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกกระตุ้นด้วย FAC ที่ 10, 50 และ 100 µg/ml เพียงอย่างเดียวเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂ 40 µM ร่วมกับ FAC 10, 50 และ 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า เซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ความเข้มข้น 10 µg/ml มีระดับของธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เซลล์ประสาท SK-N-SH กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC 50 และ 100 µg/ml มีระดับของธาตุเหล็กภายในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂ 40 µM ร่วมกับ FAC ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 µg/ml มีปริมาณของธาตุเหล็กภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC เพียงอย่างเดียวในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน นอกจากนี้

ยังพบว่ากลุ่มของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 40 μM เพียงอย่างเดียวมีการสะสมของธาตุเหล็กในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 21)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกกระตุ้นด้วย FAC จะทำให้มีการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์เพิ่มขึ้น และมีแนวโน้มจะสะสมมากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นร่วมกับ H_2O_2 ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้ FAC 100 $\mu g/ml$ ร่วมกับ H_2O_2 40 μM เนื่องจากมีระดับการสะสมของธาตุเหล็กมากที่สุด



ภาพที่ 21 แสดงปริมาณความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ calcein เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC เพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2

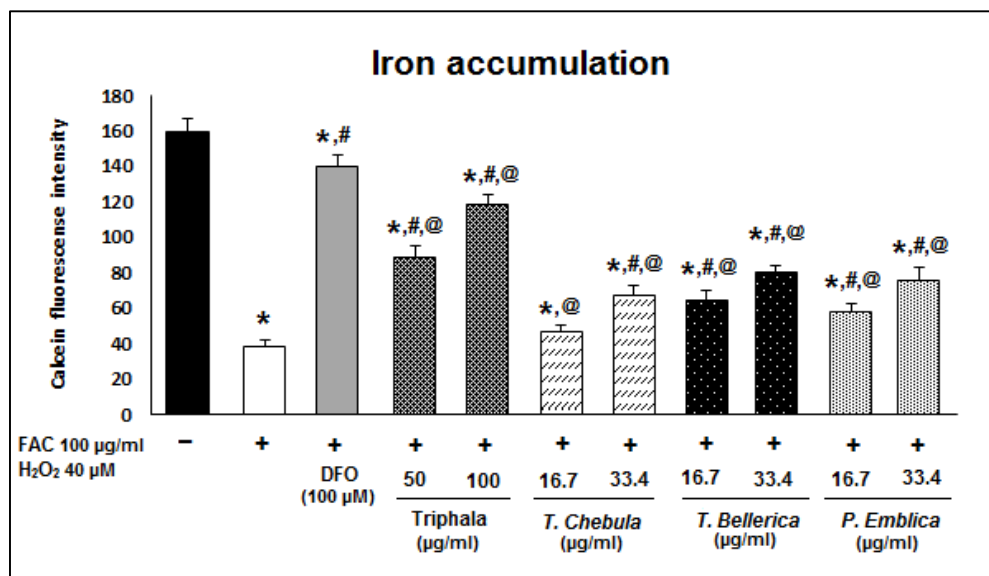
ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC ในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน

4.5 ผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดต่อการยับยั้งการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH

เพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดทั้ง 3 ชนิด ในการป้องกันการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ ในการทดลองเซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ หรือกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดทั้ง 3 ชนิด สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ระดับความเข้มข้น 16.7 และ 33.4 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 40 μM ร่วมกับ FAC 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยในการทดลองใช้ desferoxamine (DFO) เป็น positive control ซึ่ง DFO เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการจับธาตุเหล็ก (iron chelating agent)

จากการทดลองพบว่า เซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ร่วมกับ FAC มีปริมาณของธาตุเหล็กภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่เซลล์ประสาท SK-N-SH กลุ่มที่ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดในทุกความเข้มข้น ยกเว้นสมอไทยที่ความเข้มข้น 16.7 $\mu\text{g/ml}$ มีระดับของธาตุเหล็กภายในเซลล์ลดลงตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดน้ำที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ร่วมกับ FAC นอกจากนี้ยังพบว่าการ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสะสมของธาตุเหล็กดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดในทุกกลุ่มการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่กระตุ้นด้วย DFO ผลปรากฏว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย DFO มีระดับการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์น้อยกว่าของสารสกัดน้ำตรีผลาและของสมุนไพรวัดในทุกกลุ่มความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 22)

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดมีประสิทธิภาพในการป้องกันการสะสมของธาตุเหล็กในเซลล์ประสาท SK-N-SH ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดน้ำ โดยที่สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสะสมของธาตุเหล็กดีกว่าสารสกัดจากสมุนไพรวัดทั้ง 3 ชนิด แต่ยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่า DFO ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการจับธาตุเหล็ก



ภาพที่ 22 แสดงปริมาณความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ calcein ในเซลล์ประสาท SK-N-SH

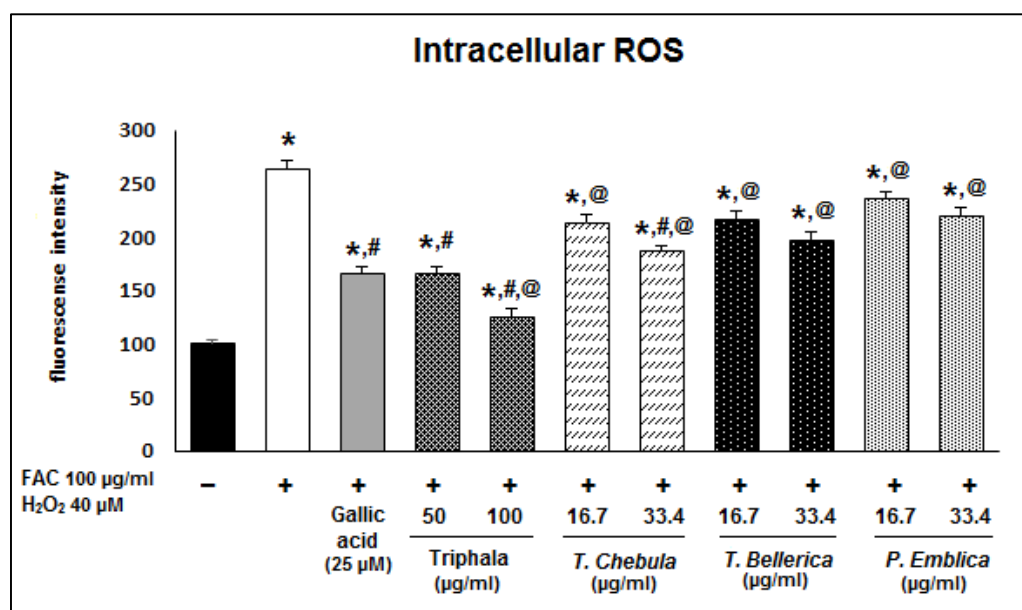
ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้น FAC กับ H₂O₂ และ @ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย DFO

4.6 ผลการยับยั้งของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดเดียวต่อการสะสมของ Reactive Oxygen Species ภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH

เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดเดียวทั้ง 3 ชนิด ในการลดการสะสมของ Reactive Oxygen Species ภายในเซลล์หรือ intracellular ROS ด้วยเทคนิค CM-H₂DCFDA fluorescence probe ในการทดลองเซลล์ประสาท SK-N-SH ได้ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml หรือกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ความเข้มข้น 16.7 และ 33.4 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂ ร่วมกับ FAC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่าระดับ intracellular ROS ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H₂O₂ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่เซลล์ประสาท SK-N-SH กลุ่มที่ pretreatment ด้วย gallic acid สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml และสารสกัดน้ำจากสมอไทยที่ความเข้มข้น 33.4 µg/ml พบว่าระดับ intracellular ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H₂O₂ นอกจากนี้สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาความเข้มข้น 100 µg/ml

มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสะสมของ ROS ได้ดีกว่า gallic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด กับ gallic acid พบว่า gallic acid ประสิทธิภาพในการยับยั้งการสะสมของ ROS สูงกว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด ในทุกกลุ่มความเข้มข้น (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 แสดงปริมาณ ROS ภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้น FAC กับ H₂O₂ และ @ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาทั้ง 50 และ 100 µg/ml และสารสกัดน้ำจากลูกสมอไทย (*T. Chebula*) ความเข้มข้น 33.4 µg/ml มีประสิทธิภาพในการลดระดับของ ROS ภายในเซลล์ และยังพบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีประสิทธิภาพดีกว่า gallic acid ซึ่งเป็น positive control ในขณะที่สารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 16.7 µg/ml ไม่สามารถลดระดับของ ROS ภายในเซลล์ได้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวในตำรับในการลดระดับ intracellular ROS

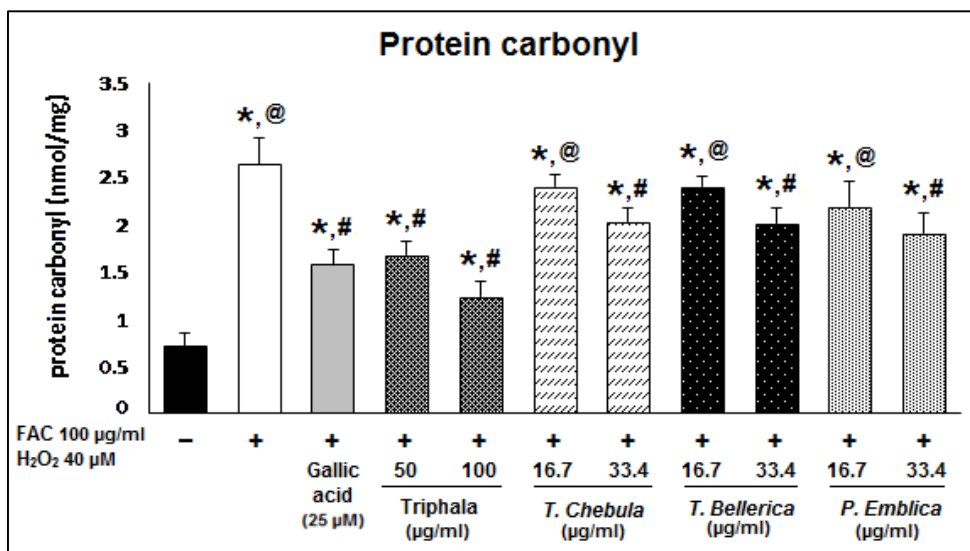
4.7 ผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดต่อการยับยั้งระดับโปรตีนคาร์บอนิล (protein carbonyl) ของเซลล์ประสาท SK-N-SH

เพื่อทดสอบผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดต่อการลดระดับ protein carbonyl ภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH โดย protein carbonyl เป็น marker หนึ่งที่สามารถตรวจสอบภาวะการสะสมของ oxidative stress ที่เกิดภายในเซลล์ได้ โดยการทดลองครั้งนี้ DNPH ถูกนำมาใช้ตรวจสอบระดับ protein carbonyl ที่เกิดขึ้นในเซลล์ประสาท SK-N-SH ในการทดสอบเซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ หรือจากสมุนไพรวัดเดี่ยว เช่น สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ระดับความเข้มข้น 16.7 และ 33.4 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 40 μM ร่วมกับ FAC 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า เซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC และ H_2O_2 มีปริมาณ protein carbonyl เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่เซลล์ประสาท SK-N-SH กลุ่มที่ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาทั้ง 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ รวมถึงสารสกัดน้ำของสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ มีระดับของ protein carbonyl ลดลงตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC และ H_2O_2

เมื่อเปรียบเทียบกับ gallic acid ซึ่งเป็น positive control พบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาทั้ง 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ รวมถึงสารสกัดน้ำของสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ สามารถการยับยั้งการสะสมของระดับ protein carbonyl ภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH ไม่แตกต่างจาก gallic acid นอกจากนี้ยังพบว่า pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำของสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ระดับความเข้มข้น 16.7 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถยับยั้งการสะสมของ protein carbonyl ในเซลล์ประสาท SK-N-SH เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC และ H_2O_2 (ภาพที่ 24)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาทั้ง 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ gallic acid ในการยับยั้งการสะสมของ protein carbonyl ในเซลล์ประสาท SK-N-SH และสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีประสิทธิภาพที่จะยับยั้งการสะสมของ protein carbonyl ดีกว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด



ภาพที่ 24 แสดงระดับ protein carbonyl ของเซลล์ประสาท SK-N-SH

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย H₂O₂ ร่วมกับ FAC และ @ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid

4.8 ผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรเดี่ยวต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ประสาท SK-N-SH

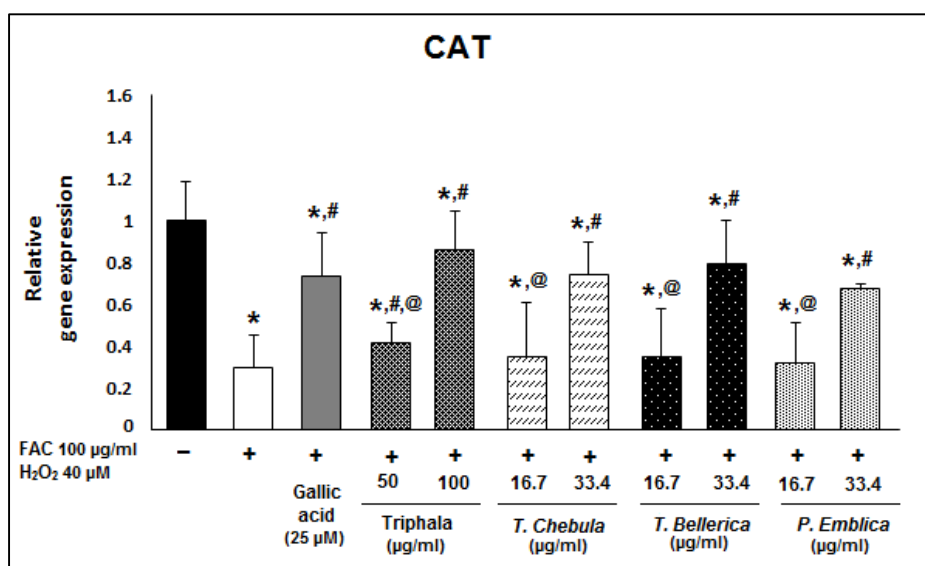
เพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ประสาท SK-N-SH ด้วยเทคนิค qPCR ในการทดลองเซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกเลี้ยงในสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml หรือเลี้ยงจากสมุนไพรเดี่ยว คือ สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ระดับความเข้มข้น 16.7 และ 33.4 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂ 40 µM ร่วมกับ FAC 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี gallic acid เป็น positive control หลังจากนั้นเซลล์ประสาท SK-N-SH จะถูกนำมาสกัด RNA และวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค qPCR

4.8.1 การแสดงออกของยีนคะตะเลส (CAT)

CAT ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย H_2O_2 ให้เป็น H_2O และ O_2 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่กระตุ้นด้วย H_2O_2 ร่วมกับ FAC มีการแสดงออกของยีน CAT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu g/ml$ รวมถึงสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ความเข้มข้น 33.4 $\mu g/ml$ มีการแสดงออกของ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2

และเมื่อเปรียบเทียบกับ gallic acid พบว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ความเข้มข้น 50 $\mu g/ml$ รวมถึงสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ความเข้มข้น 16.7 $\mu g/ml$ มีการแสดงออกของ CAT น้อยกว่ากลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย gallic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 25)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา (50 และ 100 $\mu g/ml$) สารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ความเข้มข้น 33.4 $\mu g/ml$ รวมถึง gallic acid มีประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับการแสดงออกยีน CAT ซึ่งมีหน้าที่ลดปริมาณ H_2O_2 ภายในเซลล์ ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าประสิทธิภาพในการเพิ่มการแสดงออกของยีน CAT ของทั้งสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวในตำรับทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 25 แสดงผลการแสดงออกของยีน CAT

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย H₂O₂ ร่วมกับ FAC และ @ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid

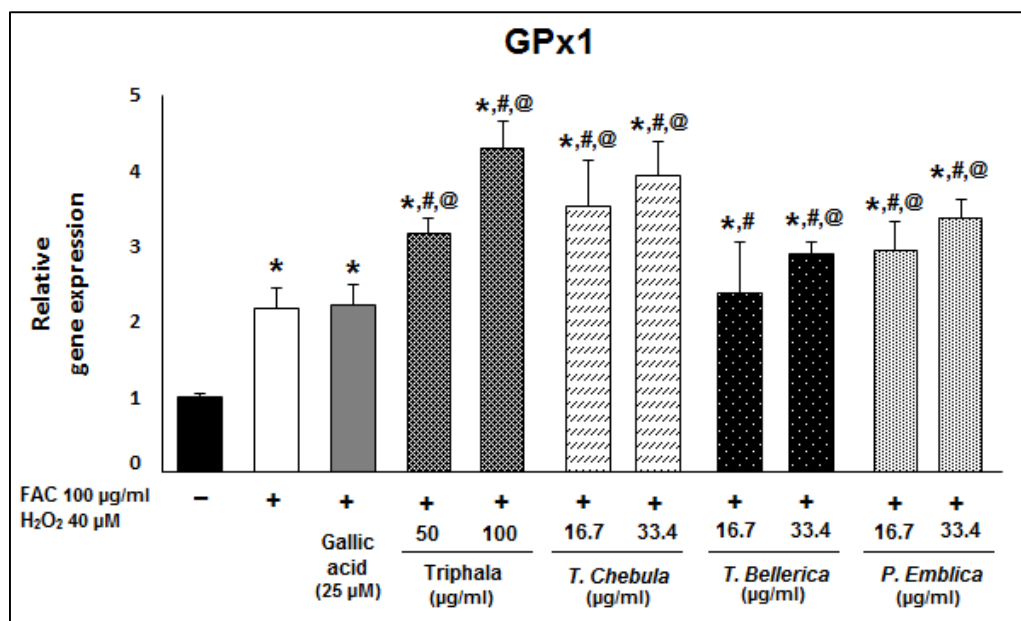
4.8.2 การแสดงออกของยีนกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส 1 (GPx1)

GPx1 ทำหน้าที่ในการสลาย H₂O₂ ให้เป็นน้ำ เพื่อป้องกันไม่ให้ H₂O₂ ถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ผลการทดลองพบว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH กลุ่มที่กระตุ้นด้วย H₂O₂ ร่วมกับ FAC มีการแสดงออกของยีน GPx1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวทั้ง 3 ชนิด พบว่าการแสดงออกของ GPx1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกกลุ่มความเข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂ ร่วมกับ FAC

ในขณะที่กลุ่มที่ pretreatment ด้วย gallic acid มีการแสดงออกของ GPx1 ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂ ร่วมกับ FAC นอกจากนี้ยังพบว่า pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวในทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้นกลุ่ม pretreatment ด้วยสารสกัดจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) ที่ 16.7 µg/ml มีการแสดงออกของ GPx1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ gallic acid (ภาพที่ 26)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวจากตำรับยาตรีผลา มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการแสดงออกของยีน GPx1 ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในการกำจัด H₂O₂ ภายในเซลล์ ในการ

ทดลองนี้พบว่า gallic acid ซึ่งเป็น positive control มีประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของ GPx1 ได้ไม่ดีเท่าสารสกัดน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของ GPx1 ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมอไทยใกล้เคียงกัน ซึ่งสารสกัดน้ำทั้งจากตำรับยาตรีผลาและสมอไทยมีประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของ GPx1 สูงกว่ากลุ่มของสารสกัดน้ำจากสมอพิเภกและมะขามป้อม



ภาพที่ 26 แสดงผลการแสดงออกของยีน GPx1

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย H₂O₂ ร่วมกับ FAC และ @ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid

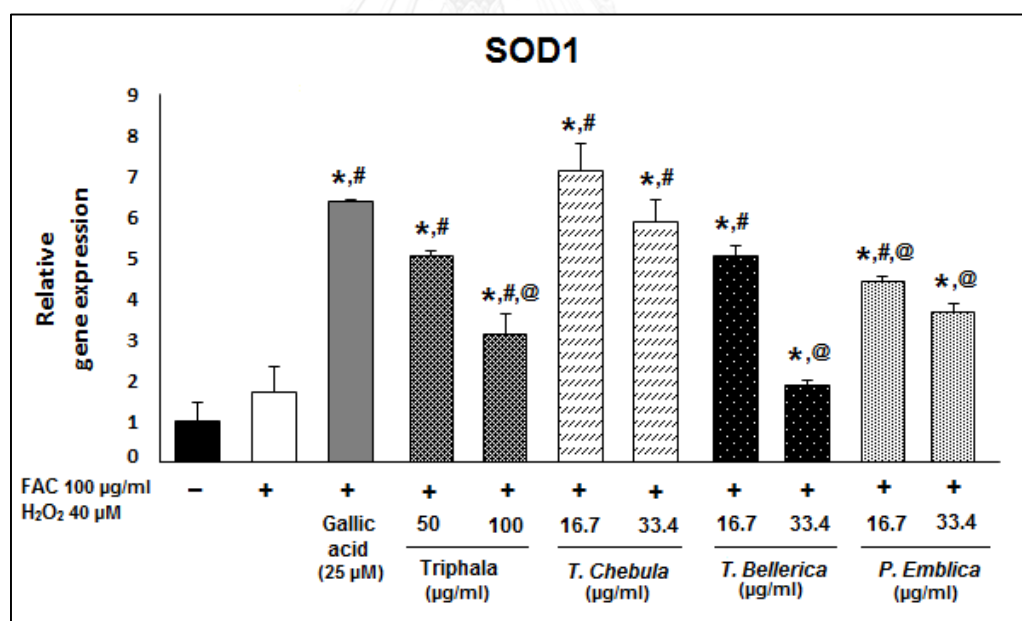
4.8.3 การแสดงออกของยีนซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส 1 (SOD1)

SOD1 มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาสลาย O₂⁻ โดยเปลี่ยน O₂⁻ ไปเป็น H₂O₂ และ O₂ ผลการทดลองพบว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่กระตุ้นด้วย H₂O₂ ร่วมกับ FAC มีการแสดงออกของยีน SOD1 เพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การแสดงออกของยีน SOD1 ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวในทุกกลุ่มความเข้มข้น มีการแสดงออกของยีน SOD1 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH กลุ่มที่ pretreatment ในสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวทุกกลุ่มความเข้มข้น ยกเว้นกลุ่มที่ของสาร

สกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) ความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ มีการแสดงออกของ SOD1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย H_2O_2 ร่วมกับ FAC

ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับ gallic acid พบว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH ในกลุ่มที่ pretreatment ในสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) ความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ และสารสกัดน้ำจากมะขามป้อม (*P. Emblica*) ทั้งความเข้มข้น 33.4 และ 16.7 $\mu\text{g/ml}$ มีการแสดงออกของยีน SOD1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) ความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ มีระดับการแสดงออกของ SOD1 น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวในกลุ่มอื่นๆ (ภาพที่ 27)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวทั้ง 3 ชนิด ยกเว้นกลุ่มที่ถูกเลี้ยงในสารสกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) ความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ และ gallic acid มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการแสดงออกของ SOD1 ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์



ภาพที่ 27 แสดงผลการแสดงออกของยีน SOD1

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย $*p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย H_2O_2 ร่วมกับ FAC และ @ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid

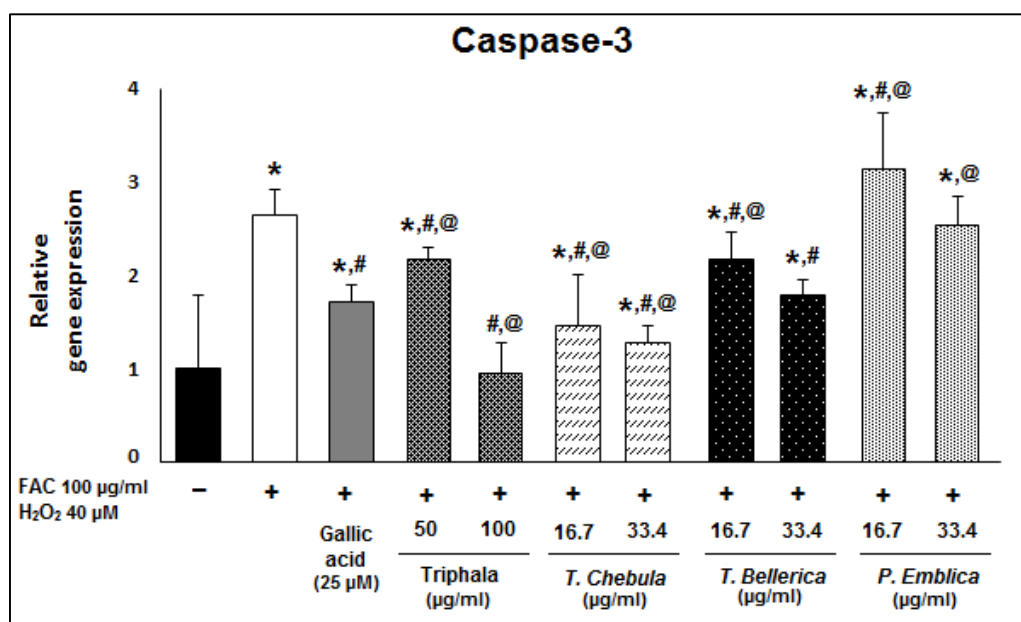
4.9 ผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ของเซลล์ประสาท SK-N-SH

เพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ประสาท SK-N-SH โดยในการทดลองเซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกเลี้ยงในสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ หรือจากสมุนไพรวัด ได้แก่ สมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ระดับความเข้มข้น 16.7 และ 33.4 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 40 μM ร่วมกับ FAC 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี gallic acid เป็น positive control หลังจากนั้นเซลล์ประสาท SK-N-SH ทุกกลุ่มถูกนำไปสกัด RNA และวัดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค qPCR

4.9.1 ผลการแสดงออกของยีน caspase-3

caspase-3 เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis เนื่องจากควบคุมทั้ง intrinsic และ extrinsic pathway ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ caspase-3 ในเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 มีการแสดงออกของ caspase-3 เพิ่มขึ้นมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม และเมื่อ pretreatment เซลล์ประสาท SK-N-SH ด้วย gallic acid สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) สารสกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) ความเข้มข้น 16.7 และ 33.4 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีการแสดงออกของ caspase-3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2

ในขณะที่ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากมะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ความเข้มข้น 16.7 $\mu\text{g/ml}$ มีการแสดงออกของยีน caspase-3 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 นอกจากนี้ยังพบว่าการ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ 100 $\mu\text{g/ml}$ และสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) 33.4 $\mu\text{g/ml}$ มีการแสดงออกของ caspase-3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ pretreatment ด้วย gallic acid (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 แสดงผลการแสดงออกของยีน caspase-3

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย H₂O₂ ร่วมกับ FAC และ @ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid

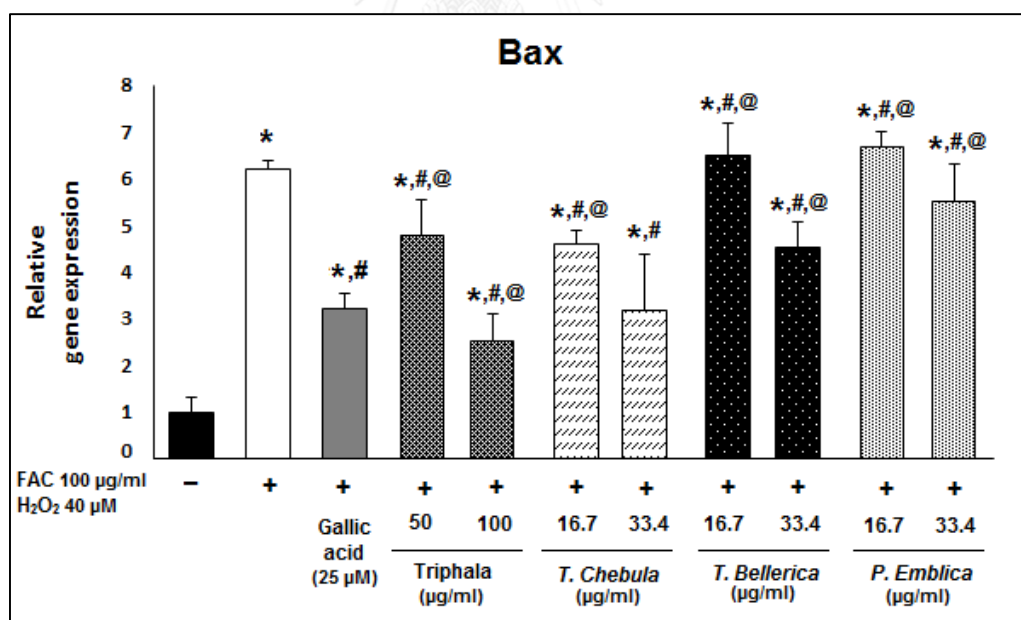
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ประสาท SK-N-SH ด้วย H₂O₂ ร่วมกับ FAC มีผลในการเพิ่มการแสดงออกของ caspase-3 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย gallic acid สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ความเข้มข้น 50 และ 100 μg/ml สารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) สารสกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) ที่ความเข้มข้น 16.7 และ 33.4 μg/ml มีประสิทธิภาพในการลดการแสดงออกของ caspase-3 นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ 100 μg/ml มีประสิทธิภาพดีที่สุดในในการลดการแสดงออกของ caspase-3 โดยมีระดับการแสดงออกของ caspase-3 ไม่แตกต่างกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม

4.9.2 ผลการแสดงออกของยีน Bax

Bax เป็นยีนในกลุ่ม pro-apoptotic genes ทำหน้าที่กระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของ Bax เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂ ร่วมกับ FAC ในขณะที่เซลล์ประสาท SK-N-SH กลุ่มที่ pretreatment ด้วย gallic acid สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ความ

เข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) ที่ 16.7 และ 33.4 $\mu\text{g/ml}$ และสารสกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) และ มะขามป้อม (*P. Emblica*) ที่ระดับความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ มีการแสดงออกของ caspase-3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ร่วมกับ FAC ขณะที่ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่มีความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีการแสดงออกของ caspase-3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ gallic acid ซึ่งเป็น positive control พบว่า (ภาพที่ 29)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ประสาท SK-N-SH ด้วย H_2O_2 ร่วมกับ FAC มีผลในการเพิ่มการแสดงออกของ Bax ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม pro-apoptotic genes ในขณะที่เมื่อกระตุ้นเซลล์ประสาท SK-N-SH ด้วย gallic acid สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา (50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$) สารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) (16.7 และ 33.4 $\mu\text{g/ml}$) และสารสกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. Bellerica*) และมะขามป้อม (*P. Emblica*) (33.4 $\mu\text{g/ml}$) มีประสิทธิภาพในการลดการแสดงออกของ Bax และยังพบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ 100 $\mu\text{g/ml}$ มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการลดการแสดงออกของ Bax โดยสามารถลดระดับการแสดงออกของ Bax ได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid และสารสกัดน้ำจากสมุนไพรในกลุ่มอื่นๆ



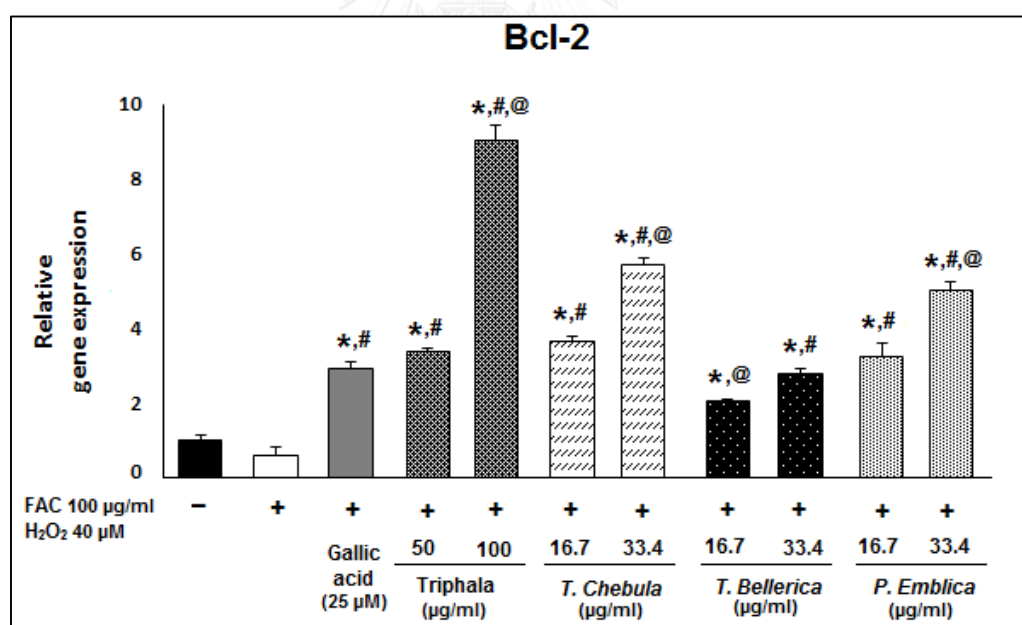
ภาพที่ 29 แสดงผลการแสดงออกของยีน Bax

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย $*p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย H_2O_2 ร่วมกับ FAC และ @ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid

4.9.3 ผลการแสดงผลของยีน Bcl-2

Bcl-2 เป็นยีนในกลุ่ม anti-apoptotic genes ทำหน้าที่ยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis ผลการทดลองพบว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดเพียง 3 ชนิด ในทุกกลุ่มความเข้มข้น มีระดับการแสดงออกของ Bcl-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย H_2O_2 ร่วมกับ FAC นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ และจากสมอไทย (*T. Chebula*) ที่ความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ มีการแสดงออกของ Bcl-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid (ภาพที่ 30)

จากผลการทดลองที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมุนไพรวัดเพียง 3 ชนิด มีความสามารถในการเพิ่มการแสดงออกของยีน Bcl-2 นอกจากนี้สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีคุณสมบัติในการเพิ่มการแสดงออกของยีน Bcl-2 ได้ดีกว่า gallic acid ซึ่งเป็น positive control ในการทดลอง



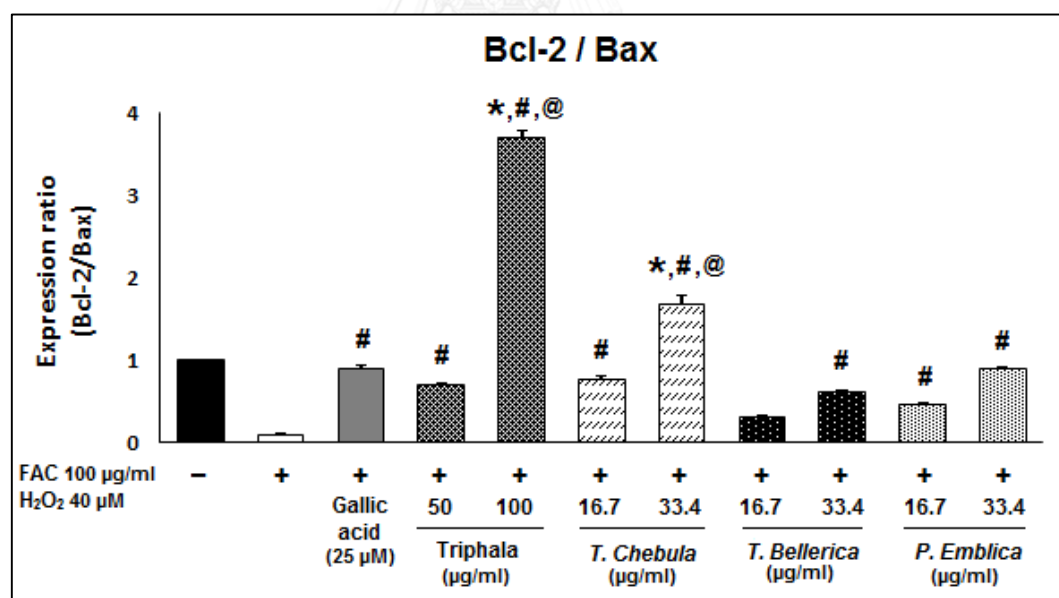
ภาพที่ 30 แสดงผลการแสดงออกของยีน Bcl-2

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (SEM) โดย $*p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, $\#p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 และ $@p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid

4.9.4 สัดส่วนผลต่างระหว่างการแสดงออกของยีน Bcl-2 กับ Bax

เมื่อนำข้อมูลการแสดงออกของ Bcl-2 และ Bax มาคำนวณเป็นสัดส่วนของการแสดงออกของยีนระหว่าง Bcl-2 และ Bax พบว่าการ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ และจากสมอไทย (*T. Chebula*) ที่ความเข้มข้น 33.4 $\mu\text{g/ml}$ มีสัดส่วนการแสดงออกของ Bcl-2 และ Bax สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสมอไทยในความเข้มข้นดังกล่าวมีสัดส่วนการแสดงออกของ Bcl-2 และ Bax สูงกว่า gallic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 31)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) (33.4 $\mu\text{g/ml}$) มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH ในการทดลอง



ภาพที่ 31 แสดงสัดส่วนระหว่างการแสดงออกของยีน Bcl-2 กับ Bax

โดย * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H₂O₂ และ @ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย gallic acid

บทที่ 5

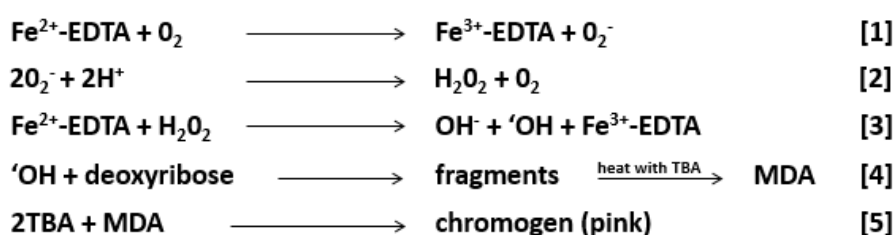
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การตายของเซลล์ประสาทเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท หรือ neurodegenerative disease โดยมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากปฏิกิริยา Fenton's reaction เป็นเหตุให้มีการสะสมของ OH^- ภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก ดังนั้นการลดภาวะ oxidative stress ในเซลล์ประสาทจึงเป็นหนึ่งในเป้าหมายหลักที่น่าสนใจในการป้องกันและรักษาโรค neurodegenerative disease (20)

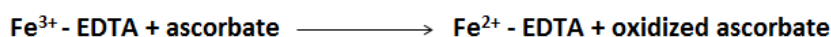
ตรีผลา (Triphala) เป็นตำรับยาพื้นบ้านที่คนไทยใช้ในการรักษาโรคและการส่งเสริมสุขภาพมานาน ในตำรับยาประกอบไปด้วยสมุนไพรรวม 3 ชนิด ได้แก่ สมอไทย (*T. chebula*) สมอพิเภก (*T. belerica*) และมะขามป้อม (*P. emblica*) ซึ่งนิยมรับประทานโดยการนำไปต้มในน้ำเดือดและดื่มเป็นชา การศึกษาองค์ประกอบในสมุนไพรรวมทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีสารประกอบประเภท polyphenol เป็นองค์ประกอบหลัก เช่น gallic acid ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบมากที่สุด ในสมุนไพรรวมทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ยังพบรายงานของสารประเภท polyphenol ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (45) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการป้องกันโรค neurodegenerative diseases ผ่านทางการควบคุม apoptotic signaling pathways (96, 97) เนื่องจากสารประเภท polyphenol เป็นองค์ประกอบที่พบได้มากในธรรมชาติ และยังพบเป็นองค์ประกอบหลักของตำรับยาตรีผลาอีกด้วย การศึกษาในครั้งนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรรวมทั้ง 3 ชนิดในตำรับยา โดยในการทดลองผู้ศึกษาได้ลดความเข้มข้นของสมุนไพรรวมทั้งทุกชนิดเหลือเพียง 1 ใน 3 ตามสัดส่วนองค์ประกอบจริงในตำรับยาตรีผลา เนื่องจากต้องการเปรียบเทียบสัดส่วนการออกฤทธิ์ของสมุนไพรรวมทั้งเดี่ยวและสมุนไพรรวมแบบตำรับ

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรรวมทั้งเดี่ยวและสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาในการต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรรวมทั้งเดี่ยวด้วยวิธี deoxyribose assay โดยมี mannitol เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรรวมทั้งเดี่ยวในตำรับสามารถลดการทำลายโมเลกุลของน้ำตาล deoxyribose จากอนุมูลไฮดรอกซิลได้อย่างมีประสิทธิภาพตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดน้ำที่เพิ่มขึ้น โดยพิจารณาจากค่า 50% inhibition ของสารสกัดน้ำจากตรีผลามีค่าเท่ากับ 0.812 mg/ml (ภาพที่ 11) และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า 50% inhibition ของสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) สมอพิเภก (*T. Bellerica*) มะขามป้อม (*P. Emblica*) ซึ่งมีค่า 0.945, 0.915 และ 0.994 mg/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 13) จากผลการทดลองจะ

เห็นว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา มีประสิทธิภาพในการกำจัด OH^{\cdot} ได้ดีกว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยว โดย Gutteridge และ Halliwell ได้อธิบายกลไกที่มีความเป็นไปได้ในการยับยั้งการทำลายโมเลกุลของน้ำตาล deoxyribose ว่าสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำลายโมเลกุลของน้ำตาล deoxyribose ในปฏิกิริยาอาจประกอบด้วยโมเลกุลที่มีความสามารถในการจับกับโลหะหนัก เช่น เหล็ก ซึ่งสามารถยับยั้งกระบวนการทำลายน้ำตาล deoxyribose จากอนุมูลไฮดรอกซิลที่เกิดจาก Fenton's reaction ได้ (98) และเนื่องจากการทดลองนี้เป็นการทดลองในหลอดทดลองโดยมีกลไกในการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลผ่านปฏิกิริยาดังนี้



นอกจากนี้ในการทดลองยังใช้ ascorbic acid ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น reducing agent ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนกับ ferric iron (Fe^{3+}) แล้วเปลี่ยนให้เป็น ferrous iron (Fe^{2+}) เพื่อให้ปฏิกิริยาไม่ขาด substrate ในการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิล ดังสมการเคมีต่อไปนี้



ดังนั้น gallic acid ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น reducing agent เช่นเดียวกับ ascorbic acid ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการทำลายโมเลกุลของน้ำตาล deoxyribose จึงไม่สามารถใช้เป็น control ในการทดลองนี้ได้ (92)

เมื่อพบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ ผู้วิจัยจึงศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรเดี่ยวในเซลล์ประสาท SK-N-SH โดยพิจารณาจากปริมาณ cell viability ด้วยเทคนิค MTT assay พบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 17) ในขณะที่สารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. chebula*) และมะขามป้อม (*P. emblica*) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ และสารสกัดน้ำจากสมอพิเภก (*T. belerica*) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ความเข้มข้น 300 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ประสาทในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 18) ซึ่งถ้าพิจารณาจากปริมาณ cell viability จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีความเป็นพิษต่ำกว่าสารสกัดน้ำ

จากสมุนไพรวัดเดียวในตำรับทั้ง 3 ชนิดเมื่อเปรียบเทียบในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน ในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นที่มีปริมาณ cell viability ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมมากที่สุด และเมื่อทดสอบความเป็นพิษของ gallic acid ต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH พบว่าเริ่มมีความเป็นพิษกับเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 50 μM (ภาพที่ 19) ดังนั้นจึงเลือก gallic acid ในความเข้มข้น 25 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH เพื่อใช้เป็น positive control ในการทดลอง ซึ่ง Russell และคณะได้รายงานไว้ในสารสกัดตรีผลาความเข้มข้น 3,750 ng/ml มีความเข้มข้นของ gallic acid อยู่เท่ากับ $89.02 \pm 5.67 \text{ ng/ml}$ หรือคิดเป็น 2.4% w/w ของ phenolic acid ที่พบในสารสกัดตรีผลา (99) แต่เนื่องจากผู้ศึกษาต้องการเห็นความแตกต่างของผลการทดลองที่ชัดเจน การทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ gallic acid สูงกว่าความเข้มข้นจริงที่พบในตำรับ

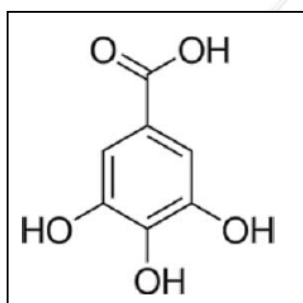
ด้วยภาวะที่ธาตุเหล็กสะสมในเซลล์ประสาทส่งผลให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิลซึ่งเป็นสาเหตุของ oxidative stress และปัจจัยของการเกิด neurodegenerative disease ด้วยเหตุนี้การป้องกันการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ประสาทจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถป้องกันการเกิดโรค neurodegenerative disease ในผู้สูงอายุได้ (100) การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้ FAC และ H_2O_2 สำหรับการจำลองภาวะ oxidative stress ในเซลล์ประสาท SK-N-SH จึงได้ทดสอบความเป็นพิษของ FAC และ H_2O_2 ต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH โดยพบว่า FAC ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ เป็นระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH และความเป็นพิษจะเพิ่มขึ้นตามลำดับความเข้มข้นของ FAC (ภาพที่ 14) อันเป็นผลมาจากการสะสมของธาตุเหล็กในเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ FAC (ภาพที่ 21) นอกจากนี้พบ LD50 ของ H_2O_2 ต่อเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ระดับความเข้มข้น 57.39 μM (ภาพที่ 15) แต่เมื่อใช้ FAC ร่วมกับ H_2O_2 พบว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH ตายเพิ่มขึ้นกว่าการใช้ H_2O_2 หรือ FAC เพียงอย่างเดียวที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน (ภาพที่ 16) อีกทั้งยังพบการสะสมของเหล็กในเซลล์เพิ่มมากขึ้นกว่าการใช้ FAC เพียงอย่างเดียว ซึ่ง Dev และคณะได้อธิบายไว้ว่า เป็นผลมาจากการที่ H_2O_2 เข้าไปลดการแสดงออกของ Ferritin-H (Ft-H) และ ferroportin (Fpn) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่หลักในการควบคุมสมดุลของการสะสมและนำธาตุเหล็กออกนอกเซลล์ประสาทตามลำดับ จึงทำให้พบการสะสมของธาตุเหล็กในเซลล์ประสาทเพิ่มมากขึ้น (101) แต่อย่างไรก็ตามปริมาณธาตุเหล็กที่สะสมในเซลล์ประสาทของทั้ง 2 กลุ่มก็ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 16) จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสันนิษฐานว่า FAC และ H_2O_2 ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทมากขึ้นจากระดับ ROS ภายในเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น ในเมื่อทดสอบสมมติฐานจากการทดลองของระดับ ROS ภายในเซลล์ ในเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 (ภาพที่ 23) พบว่ามีระดับ ROS เพิ่มสูงขึ้น เพราะธาตุ

เหล็กและ H_2O_2 เร่งปฏิกิริยา Fenton's reaction และผลิต OH^\cdot มากขึ้น (34) ซึ่งมีผลกับการเพิ่มระดับ ROS ภายในเซลล์และเพิ่มอัตราการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH

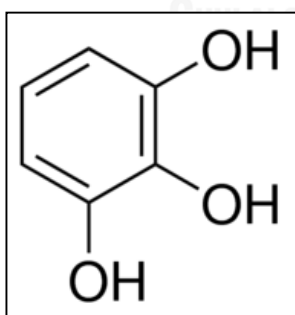
เมื่อพบว่า FAC และ H_2O_2 มีความเป็นพิษและทำให้เซลล์ประสาท SK-N-SH ตายเพิ่มขึ้น ผู้ศึกษาจึงศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH โดยใช้ FAC ร่วมกับ H_2O_2 กระตุ้นให้เกิด oxidative stress พบว่า pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา (50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$) สารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียว (16.7 และ 33.4 $\mu\text{g/ml}$) และ gallic acid สามารถลดการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH ในการทดลองนี้ได้ลดความเข้มข้นของสมุนไพรวัดเดียวตามสัดส่วนของตำรับเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานโดยรวมของตำรับยาตรีผลาว่ามาจากสมุนไพรวัดเดียวตัวใดเป็นหลัก พบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH ดีกว่าการใช้สารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียว (ภาพที่ 20) ดังนั้นประสิทธิภาพในการลดการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาจึงน่าจะมาจากการทำงานร่วมกันของสมุนไพรวัดเดียวทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ และ gallic acid ไม่แตกต่างกัน ในการทดลองนี้ใช้ gallic acid เป็น positive control ซึ่งมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (48) นอกจากนี้ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับรายงานที่พบในสัตว์ทดลองถึงประสิทธิภาพของ gallic acid ในการป้องกันภาวะเสื่อมของระบบประสาท เช่น อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน และ cerebral ischemia (102-107) จากผลการทดลองข้างต้นจึงอาจสันนิษฐานได้ว่าฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและจากสารสมุนไพรวัดเดียวในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH น่าจะมาจากคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของ gallic acid เป็นหลักและสารประกอบประเภท polyphenol อื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบในตำรับ เช่น tannic acid, ascorbic acid, syringic acid, epicatechin, chebulic acid, chebulagic acid เป็นต้น (45)

หลังจากที่พบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH จึงได้ศึกษากลไกในการป้องกัน เช่น การยับยั้งการสะสมของธาตุเหล็กในเซลล์ประสาท SK-N-SH, การลดระดับ ROS ภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH, การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หรือการยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวในการป้องกันการสะสมของธาตุเหล็กในเซลล์ประสาท SK-N-SH ได้ใช้ DFO ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการจับธาตุเหล็ก (iron chelating agent) เป็น positive control ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสะสมของธาตุเหล็กในเซลล์ประสาท SK-N-SH ดีกว่าการใช้สารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของตำรับยาตรีผลากับสัดส่วนความเข้มข้นของสมุนไพรวัดเดียวในตำรับ (ภาพที่ 22) การที่สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามี

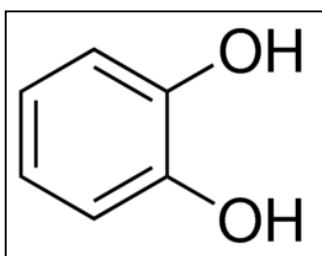
ประสิทธิภาพในการยับยั้งการสะสมของธาตุเหล็กได้ดีคาดว่าจะมาจากการทำงานร่วมกันของ สมุนไพรเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Andjelkovic ในปี 2006 (108) ที่พบว่า สารประกอบประเภท polyphenol นั้นมีความสามารถในการจับออก (chelate) ธาตุเหล็ก นอกจากนี้ยังพบรายงานของสารสกัดจากสมอไทย (*T. Chebula*) และมะขามป้อม (*P. emblica*) มีฤทธิ์ในการจับธาตุเหล็กและลดความเป็นพิษจากการสะสมของธาตุเหล็กในหนูทดลองและอาจใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการสะสมของธาตุเหล็กได้ (109, 110) แต่พบว่าการป้องกันการสะสมของธาตุเหล็กของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีฤทธิ์ดีไม่เท่าสารมาตรฐาน DFO (iron chelating agent) Khokhar และ Apenten ได้อธิบายไว้ว่าส่วนหนึ่งอาจจะเกิดจากโครงสร้างทางเคมีของ gallic acid ในตำรับยา (ภาพที่ 32) ซึ่งเป็นสารประกอบ polyphenol ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ galloyl group มีลักษณะโครงสร้างเป็น trihydroxybenzene (ภาพที่ 33) ที่แม้จะมีความสามารถในการจับออกของธาตุเหล็กแต่ก็สามารถจับธาตุเหล็กออกได้น้อยกว่าสาร polyphenol กลุ่ม catechol group ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างเป็น dihydroxybenzene (ภาพที่ 34) (111)



ภาพที่ 32 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ gallic acid หรือ 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (51)



ภาพที่ 33 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Pyrogallol จัดอยู่ในกลุ่มของ galloyl group มีลักษณะโครงสร้างแบบ trihydroxy benzene (รูปภาพจาก www.sigmaaldrich.com)



ภาพที่ 34 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Pyrocatechol จัดอยู่ในกลุ่มของ catechol group มีลักษณะโครงสร้างแบบ dihydroxybenzene (รูปภาพจาก www.sigmaaldrich.com)

ระดับ ROS ที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ส่งผลให้เซลล์สะสมภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่น่าไปสู่การตายของเซลล์ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาผลของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวในการลดระดับ ROS ภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH โดยใช้ CM-H₂DCFDA พบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีประสิทธิภาพในการลดระดับ ROS ภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH ได้ดีกว่า gallic acid และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวที่ลดเข้มข้นลงหนึ่งในสามส่วนตามสัดส่วนองค์ประกอบในตำรับ พบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีประสิทธิภาพในการลดระดับ ROS ดีกว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียว (ภาพที่ 23) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ ROS ที่ลดลงพบว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณ ROS ลดลงประมาณหนึ่งในสามตามระดับความเข้มข้นที่ลดลง ดังนั้นประสิทธิภาพในการลดระดับ ROS ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาจึงน่าจะมาจากการทำงานร่วมกันของสมุนไพรวัดเดียวที่เป็นองค์ประกอบของตำรับทั้ง 3 ชนิด อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในระดับ protein carbonyl ซึ่งเป็นผลมาจากการสะสมของ ROS (26) แล้วพบว่าระดับ protein carbonyl ในเซลล์ประสาท SK-N-SH เพิ่มขึ้นในเซลล์ประสาทกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H₂O₂ หรือกล่าวได้ว่าระดับ protein carbonyl ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับระดับ ROS ที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งพบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีประสิทธิภาพในการลดระดับ protein carbonyl ได้ดีกว่า gallic acid และสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวที่ลดความเข้มข้นลงหนึ่งในสามตามสัดส่วนองค์ประกอบในตำรับ โดยปริมาณ protein carbonyl ลดลงประมาณหนึ่งในสามตรงกับสัดส่วนความเข้มข้นที่ลดลง (ภาพที่ 24) ดังนั้นประสิทธิภาพในการลดระดับ protein carbonyl ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของระดับ ROS ภายในเซลล์ ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาจึงมาจากการทำงานร่วมกันของสมุนไพรวัดเดียวทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับรายงานของ Sun และคณะ ปี 2014 ที่ระบุว่า gallic acid ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบหลักในตำรับยาตรีผลา มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและมีประสิทธิภาพในการควบคุมภาวะ brain dysfunction โดยการควบคุมระดับ ROS ในสมอง (112) การทดลองครั้งจึงชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการลดระดับ ROS ภายในเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การป้องกันการเกิด protein oxidation จากภาวะ oxidative stress

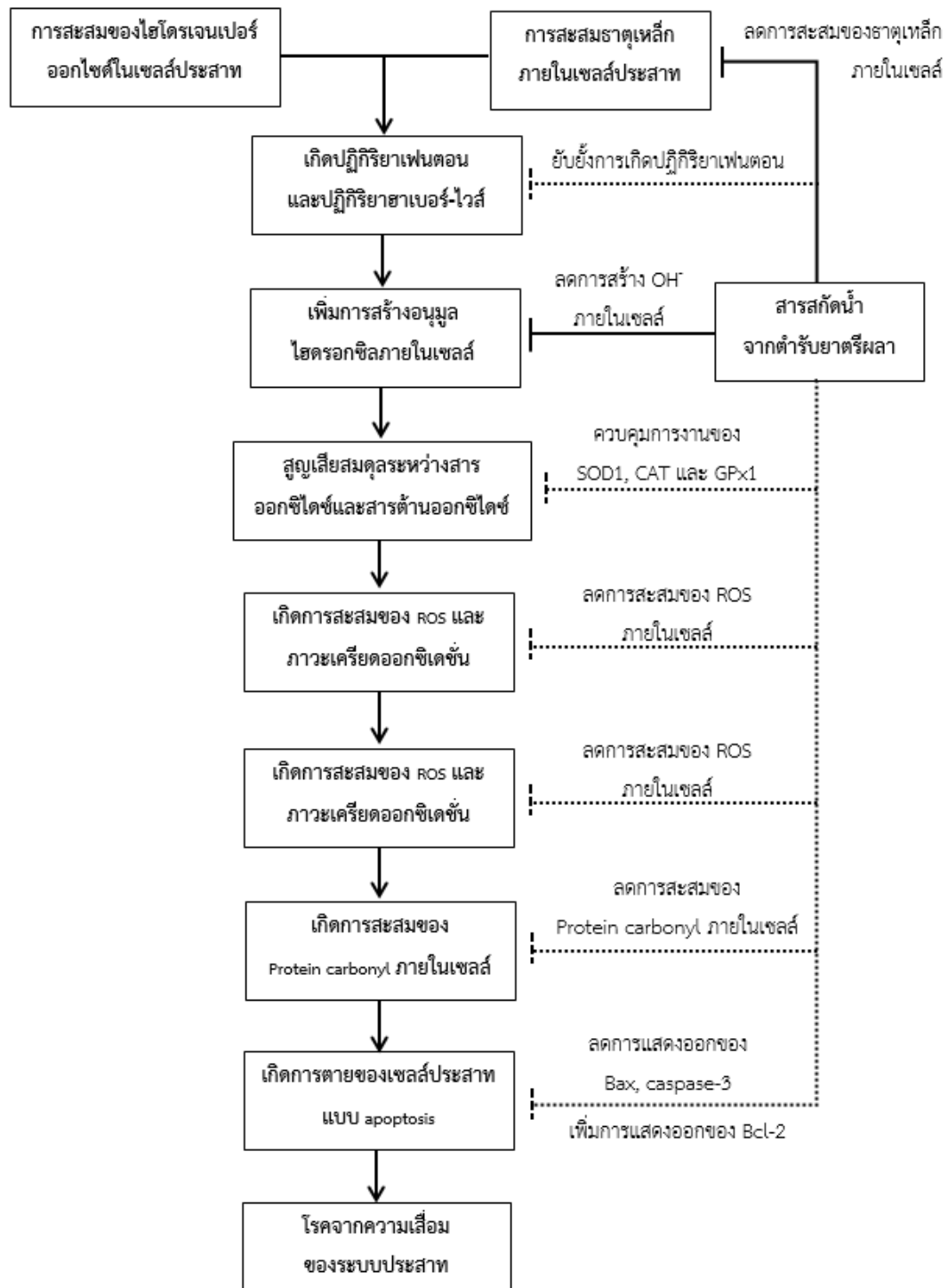
กระบวนการรักษาสมดุลของการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญในการลดภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์ (33) ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาผลของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียว ผ่านการศึกษาในระดับการแสดงออกของยีน CAT, SOD1 และ GPx1 ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ด้วยเทคนิค RTqPCR ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยีน CAT ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย H₂O₂ ให้เป็นน้ำและออกซิเจน แสดงออกลดลงเมื่อเซลล์ประสาท SK-N-SH ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H₂O₂ แต่เมื่อ

pretreatment ด้วย gallic acid สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวเดี่ยว กลับสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ CAT โดยขึ้นกับความเข้มข้น และสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาสามารถกระตุ้นได้มากที่สุด (ภาพที่ 25) การแสดงออกของ CAT ลดลงหลังจากกระตุ้นด้วย FAC และ H_2O_2 อาจจะทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากมีปริมาณของ H_2O_2 อยู่ภายในเซลล์มากเกินไปที่เซลล์จะรับได้ จึงทำให้มีการแสดงออกของ CAT ลดลง แต่เมื่อ pretreatment ด้วยสารสกัดจากตรีผลาซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ จึงมีผลให้เซลล์ตอบสนองได้ดีขึ้นโดยเพิ่มการแสดงออกของ CAT แต่เมื่อพิจารณาผลการแสดงออกของ GPx1 ซึ่งทำหน้าที่ในการสลาย H_2O_2 ให้เป็นน้ำ พบว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 มีระดับการแสดงออกของ GPx1 เพิ่มขึ้น แต่เมื่อ pretreatment ด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวเดี่ยว พบว่ามีระดับการแสดงออกของ GPx1 เพิ่มสูงขึ้น โดยที่สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ GPx1 ได้มากที่สุด และเมื่อพิจารณาในกลุ่มของสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวเดี่ยวที่ลดเข้มข้นลงหนึ่งในสามตามสัดส่วนองค์ประกอบในตำรับ พบว่าสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ GPx1 ได้มากกว่า สารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวเดี่ยวชนิดอื่น แต่ยังคงกระตุ้นการแสดงออกของ GPx1 ได้น้อยกว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา (ภาพที่ 26) จึงอาจสรุปได้ว่าในกลุ่มของเซลล์ประสาทที่กระตุ้นด้วยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีการป้องกันความเสียหายของเซลล์โดยตอบสนองการกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 ด้วยการเพิ่มการแสดงออกของ GPx1 โดยฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาส่วนใหญ่ น่าจะมาจากฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากสมอไทย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Mahesh และคณะในปี 2009 (113) ซึ่งพบว่าสารสกัดน้ำจากสมอไทยมีความสามารถในการควบคุมการทำงานของ CAT และ GPx ในตับและไตของหนูที่กระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของ GPx1 ในกลุ่ม treatment ด้วย gallic acid ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 จึงอาจสรุปได้ว่า gallic acid ไม่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการแสดงออกของ GPx1 ดังนั้นประสิทธิภาพในการกระตุ้นการแสดงออกของ GPx1 ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาจึงน่าจะมาจากองค์ประกอบอื่นในตำรับ ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อทดสอบสมมุติฐานดังกล่าว ในขณะที่เดียวกันระดับการแสดงออกของยีน SOD1 ในเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 เพิ่มสูงขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม เมื่อ pretreatment ด้วย gallic acid สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา และสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวเดี่ยว พบว่าระดับการแสดงออกของ SOD1 เพิ่มสูงขึ้นทั้งสามกลุ่ม แต่ในทางกลับกันยีน SOD1 กลับแสดงออกลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดน้ำ (ภาพที่ 27) ผลการแสดงออกของ SOD1 ไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ เพราะในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 ยีน SOD1 มีการแสดงออกมากขึ้น และเมื่อ pretreatment ด้วย gallic acid การแสดงออกของ SOD1 กลับยิ่งเพิ่มระดับขึ้น ซึ่งการตอบสนอง

ของเซลล์ต่ออนุมูลอิสระอาจจะมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง อีกทั้งช่วงเวลาของการแสดงออกของยีนแต่ละยีนต่อการตอบสนองของเซลล์ต่อภาวะเครียดออกซิเดชันแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้นักศึกษาสมบูรณ์มากขึ้น อาจจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการติดตามการแสดงออกของยีนในหลายช่วงเวลา จากผลการทดลองจะเห็นว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ประสาท SK-N-SH โดยตอบสนองการกระตุ้นผ่านการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่มีหน้าที่ในการกำจัด H_2O_2 เช่น CAT และ GPx1 ในขณะที่เดียวกันจากระดับการแสดงของ GPx1 ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของ CAT ซึ่งเหตุผลน่าจะมาจากรายงานที่พบว่าในสมองมีระดับของ GPx ค่อนข้างสูงกว่า CAT เมื่อเปรียบเทียบกับอวัยวะอื่นๆ ในร่างกาย เช่น ตับ จะมีระดับของ GPx และ CAT ในระดับที่สูงเท่าๆ กัน (114) นอกจากนี้ยังพบรายงานว่า Glutathione (GSH) ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในสมองและจะตอบสนองต่อระดับ H_2O_2 ที่เพิ่มสูงขึ้นในสมอง (115) เนื่องจาก GSH ต้องทำหน้าที่ในการให้อิเล็กตรอนเพื่อกระตุ้นการทำงานของ GPx1 ในการสลาย H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ จึงเป็นสาเหตุทำให้ระดับของ GPx1 สูงขึ้นในการทดลองครั้งนี้

ความเป็นพิษที่เกิดจากภาวะ oxidative stress ส่งผลกระทบต่อการตาย (apoptosis) ของเซลล์ประสาท โดยจะควบคุมผ่านทาง intrinsic pathway ผ่านการทำงานของโปรตีนกลุ่ม pro- และ anti-apoptotic ซึ่งจะตอบสนองต่อภาวะความเครียดที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค neurodegenerative disease (38, 116) จากผลการทดลองที่ผ่านพบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวมีประสิทธิภาพในการลดภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์ประสาท SK-N-SH ได้ ด้วยเหตุนี้ผู้ศึกษาจึงศึกษากลไกของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวในการควบคุมการแสดงออกของยีน เช่น Bax, Bcl-2 และ caspase-3 ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดย Bax และ Bcl-2 มีหน้าที่ควบคุมการหลั่ง cytochrome c จากไมโทคอนเดรียออกมาสู่ cytoplasm ซึ่งจะมีผลในการควบคุมกลไกการตายของเซลล์โดยการยับยั้งการทำงานของ caspase-3 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 มีการแสดงออกของ Bax ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม pro-apoptotic เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 28) ในขณะที่เดียวกันการกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 ไม่มีผลในการเพิ่มหรือลดการแสดงออกของ Bcl-2 ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม anti-apoptotic เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 30) เมื่อ pretreatment ด้วย gallic acid สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียว พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดการแสดงออกของ Bax โดยที่สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาสามารถลดการแสดงออกของ Bax ได้ดีที่สุด เมื่อพิจารณาผลของสมุนไพรวัดเดียวที่ลดเข้มข้นลงหนึ่งในสามตามสัดส่วนองค์ประกอบในตำรับ พบว่าสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) สามารถลดการแสดงออกของ Bax ได้มากที่สุดและมีผลการทดลองใกล้เคียงกับสารสกัด

น้ำจากตำรับยาตรีผลา (ภาพที่ 29) ในขณะเดียวกันพบการแสดงออกของ Bcl-2 เพิ่มขึ้นเมื่อ pretreatment ด้วย gallic acid สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัว โดยสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ Bcl-2 ได้มากที่สุด ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลของสารสกัดจากสมุนไพรวัวพบว่าสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) และสารสกัดน้ำจากมะขามป้อม (*P. emblica*) สามารถเพิ่มการแสดงออกของ Bcl-2 ได้มาก แต่ประสิทธิภาพยังต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลา ดังนั้นประสิทธิภาพของการกระตุ้นการแสดงออกของ Bcl-2 ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาน่าจะเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) และสารสกัดน้ำจากมะขามป้อม (*P. emblica*) (ภาพที่ 30) เมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนระหว่าง Bcl-2 (anti-apoptotic gene) ต่อ Bax (pro-apoptotic gene) พบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาเพิ่มสัดส่วนดังกล่าว ซึ่งสะท้อนถึงการยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis (ภาพที่ 31) จากนั้นจึงศึกษาระดับการแสดงออกของยีน caspase-3 ซึ่งเป็นยีนตัวสุดท้ายที่จะถูกกระตุ้นเมื่อเซลล์เข้าสู่ภาวะการตายแบบ apoptosis ผลการทดลองพบว่าเซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 มีผลในการเพิ่มระดับการแสดงออกของ caspase-3 แต่เมื่อ pretreatment ด้วย gallic acid สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัว พบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาสามารถลดการแสดงออกของ caspase-3 ได้ดีที่สุด อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวชนิดอื่น และให้ผลใกล้เคียงกับสารสกัดน้ำจากตรีผลา (ภาพที่ 28) ดังนั้นฤทธิ์ในการลดการแสดงออกของ caspase-3 ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาจึงน่าจะมาจากฤทธิ์ของสมอไทย ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการควบคุมการแสดงออกของ Bax และ Bcl-2 ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีรายงานถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากมะขามป้อมในการควบคุมการแสดงออกของ Bcl-2 และ Bax ในสมองและตับของหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress (117, 118) ในขณะเดียวกันการศึกษาคั้งนี้เป็นครั้งแรกที่รายงานผลของสารสกัดน้ำจากสมอไทย (*T. Chebula*) ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ประสาท การทดสอบนี้สามารถยืนยันกลไกในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวอันเกิดจากการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis และแสดงให้เห็นถึงการทำงานร่วมกันของสมุนไพรวัวทั้ง 3 ชนิดในตำรับ ทำให้สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เพียงสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัวตัวใดตัวหนึ่งในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH



ภาพที่ 35 สรุปผลของสารสกัดน้ำจากตัวรับยาตรีผลาในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากการสะสมของธาตุเหล็กและความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (เส้นทึบแสดงผลกระทบทางตรง เส้นประแสดงผลกระทบทางอ้อม)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปผลการทดลองได้ว่า (ภาพที่ 35) สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวสามารถยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH จากความเป็นพิษของ H_2O_2 ร่วมกับการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ได้ โดยสารสกัดน้ำสามารถลดการสะสมของธาตุเหล็กภายในเซลล์ ลดการสะสมของระดับ ROS จึงลดการทำลายโปรตีนภายในเซลล์จากอนุมูลอิสระ โดยผ่านการควบคุมการแสดงออกของยีนด้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเมื่อระดับ ROS ธาตุเหล็ก และ protein carbonyl ลดลง ความเป็นพิษต่อเซลล์จึงลดลง ซึ่งสะท้อนผ่านการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท SK-N-SH ได้ดีกว่าสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวในสัดส่วนความเข้มข้นในตำรับ สารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาจึงเป็นตำรับยาสมุนไพรวัดเดียวที่ช่วยในการส่งเสริมสุขภาพและป้องกันภาวะความเสื่อมของเซลล์ประสาท การศึกษานี้สามารถใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อสนับสนุนการใช้ตำรับยาตรีผลาในแง่ของการเป็นยาอายุวัฒนะในการป้องกันและส่งเสริมสุขภาพ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังเป็นการวิจัยครั้งแรกที่ศึกษาผลของสารสกัดจากตำรับยาตรีผลาในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิดโรค neurodegenerative disease ในมนุษย์

อย่างไรก็ตาม ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษา *in vitro* โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทในสารสกัดน้ำจากตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวก่อนที่จะกระตุ้นด้วย FAC ร่วมกับ H_2O_2 จึงเป็นการวัดผลของสารสกัดน้ำในเชิงป้องกันเท่านั้น ไม่สามารถสรุปหรือแปลผลในเชิงของการรักษาโรคได้ เนื่องจากข้อจำกัดของระบบ *in vitro* ที่หากปล่อยให้เซลล์บาดเจ็บจนผ่านกระบวนการตายแบบ apoptosis ไปแล้วนั้น ก็ยากที่จะย้อน (reversible) กระบวนการได้ จึงอาจจะต้องศึกษาในสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากตำรับยาตรีผลาและสารสกัดน้ำจากสมุนไพรวัดเดียวทั้งสมอไทย สมอพิเภก และมะขามป้อม ทั้งในเชิงของการป้องกัน รักษาอาการที่เกี่ยวข้องกับภาวะเสื่อมของเซลล์ในระบบประสาท และการ metabolize องค์ประกอบของสารสกัดน้ำในร่างกายต่อไป

รายการอ้างอิง

1. Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2014;13(10):1045-60.
2. Bertelsen M, Hansen LK. Neurodegeneration with brain iron accumulation. *Ugeskr Laeger.* 2015;177(22).
3. Andersen HH, Johnsen KB, Moos T. Iron deposits in the chronically inflamed central nervous system and contributes to neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(9):1607-22.
4. Lozoff B, Beard J, Connor J, Barbara F, Georgieff M, Schallert T. Long-lasting neural and behavioral effects of iron deficiency in infancy. *Nutr Rev.* 2006;64(5 Pt 2):S34-43; discussion S72-91.
5. Kumar MJ, Andersen JK. Perspectives on MAO-B in aging and neurological disease: where do we go from here? *Mol Neurobiol.* 2004;30(1):77-89.
6. Naik GH, Priyadarsini KI, Bhagirathi RG, Mishra B, Mishra KP, Banavalikar MM, et al. In vitro antioxidant studies and free radical reactions of triphala, an ayurvedic formulation and its constituents. *Phytother Res.* 2005;19(7):582-6.
7. Khan A, Nazar H, Sabir SM, Irshad M, Awan SI, Abbas R, et al. Antioxidant activity and inhibitory effect of some commonly used medicinal plants against lipid peroxidation in mice brain. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2014;11(5):83-90.
8. Dhingra D, Valecha R. Evaluation of antidepressant-like activity of aqueous and ethanolic extracts of *Terminalia bellirica* Roxb. fruits in mice. *Indian J Exp Biol.* 2007;45(7):610-6.
9. Erikson KM, Jones BC, Hess EJ, Zhang Q, Beard JL. Iron deficiency decreases dopamine D1 and D2 receptors in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001;69(3-4):409-18.
10. Ichiyama A, Hori S, Mashimo Y, Nukiwa T, Makuuchi H. The activation of bovine pineal tryptophan 5-monooxygenase. *FEBS Lett.* 1974;40(1):88-91.
11. Robert C. *Molecular Mechanisms to Clinical Consequences.* 2 ed. Chichester: John Wiley & sons, LTD; 2001.

12. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000;403(6771):776-81.
13. Ke Y, Qian ZM. Brain iron metabolism: neurobiology and neurochemistry. *Prog Neurobiol*. 2007;83(3):149-73.
14. Bruner AB, Joffe A, Duggan AK, Casella JF, Brandt J. Randomised study of cognitive effects of iron supplementation in non-anaemic iron-deficient adolescent girls. *Lancet*. 1996;348(9033):992-6.
15. Beard JL, Connor JR. Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr*. 2003;23:41-58.
16. Burhans MS, Dailey C, Beard Z, Wiesinger J, Murray-Kolb L, Jones BC, et al. Iron deficiency: differential effects on monoamine transporters. *Nutr Neurosci*. 2005;8(1):31-8.
17. Rouault TA, Cooperman S. Brain iron metabolism. *Semin Pediatr Neurol*. 2006;13(3):142-8.
18. Mukhopadhyay C.K, Dev S, Tapryal N, Mukherjee R, C M. ROLE OF REDOX AND CERULOPLASMIN IN IRON DEPOSITION IN GLIAL CELLS: IMPLICATION IN NEURODEGENERATIVE DAMAGES. *IIOAB* 2011;2(6):1-8.
19. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*. 2004;10 S18-25.
20. Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci*. 2012;322(1-2):254-62.
21. Pohanka M. Alzheimer s disease and oxidative stress: a review. *Curr Med Chem*. 2014;21(3):356-64.
22. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
23. Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med*. 1990;9(4):315-25.
24. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*. 2003;9(4):169-76.

25. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med.* 2006;10(2):389-406.
26. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003;329(1-2):23-38.
27. Chung KK, Dawson VL, Dawson TM. The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 2001;24(11 Suppl):S7-14.
28. Dasgupta A, Zheng J, Bizzozero OA. Protein carbonylation and aggregation precede neuronal apoptosis induced by partial glutathione depletion. *ASN Neuro.* 2012;4(3).
29. Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2001;103(2):373-83.
30. Floor E, Wetzel MG. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem.* 1998;70(1):268-75.
31. Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, et al. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 1997;69(5):2064-74.
32. Bizzozero OA, DeJesus G, Callahan K, Pastuszyn A. Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *J Neurosci Res.* 2005;81(5):687-95.
33. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32(8):595-603.
34. Liochev SI. The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met Ions Biol Syst.* 1999;36:1-39.
35. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 2000;149(1):43-50.
36. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science.* 1988;240(4852):640-2.

37. McCord JM. Iron, free radicals, and oxidative injury. *Semin Hematol.* 1998;35(1):5-12.
38. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 5 ed. New York: Garland Science; 2008.
39. de Almagro MC, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol.* 2012;34(3):200-11.
40. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
41. Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.* 2000;7(1):102-11.
42. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995;267(5203):1456-62.
43. Katzman R. The prevalence and malignancy of Alzheimer disease: a major killer. *Alzheimers Dement.* 2008;4(6):378-80.
44. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 1998;158(1):47-52.
45. Singh DP, Govindarajan R, Rawat AK. High-performance liquid chromatography as a tool for the chemical standardisation of Triphala--an Ayurvedic formulation. *Phytochem Anal.* 2008;19(2):164-8.
46. Pawar V, Lahorkar P, Anantha Narayana DB. Development of a RP-HPLC Method for Analysis of Triphala Curna and its Applicability to Test Variations in Triphala Curna Preparations. *Indian J Pharm Sci.* 2009;71(4):382-6.
47. Kaur S, Michael H, Arora S, Harkonen PL, Kumar S. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala--an Indian herbal drug. *J Ethnopharmacol.* 2005;97(1):15-20.
48. Kim YJ. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(6):1052-5.
49. Couto AG, Kassuya CAL, Calixto JB, Petrovick PR. Anti-inflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in spray dried powders from

Phyllanthus niruri leaves, stems, roots and whole plant. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2013;23(1):124-31.

50. Liu Y, Pukala TL, Musgrave IF, Williams DM, Dehle FC, Carver JA. Gallic acid is the major component of grape seed extract that inhibits amyloid fibril formation. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(23):6336-40.

51. Fernandes FH, Salgado HR. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. *Crit Rev Anal Chem*. 2016;46(3):257-65.

52. Kalaiselvan S, Rasool MK. The anti-inflammatory effect of triphala in arthritic-induced rats. *Pharm Biol*. 2015;53(1):51-60.

53. Kumar MS, Kirubanandan S, Sripriya R, Sehgal PK. Triphala promotes healing of infected full-thickness dermal wound. *J Surg Res*. 2008;144(1):94-101.

54. Gavhane AJ, Padmanabhan P, Kamble SP, Jangle SN. Synthesis of silver nanoparticles using extract of neem leaf and Triphala and evaluation of their antimicrobial activities. *Int J Pharm Bio Sci*. 2012;3(3):88-100.

55. Jagetia GC, Malagi KJ, Baliga MS, Venkatesh P, Veruva RR. Triphala, an ayurvedic rasayana drug, protects mice against radiation-induced lethality by free-radical scavenging. *J Altern Complement Med*. 2004;10(6):971-8.

56. Sabu MC, Kuttan R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J Ethnopharmacol*. 2002;81(2):155-60.

57. Singh DP, Mani D. Protective effect of Triphala Rasayana against paracetamol-induced hepato-renal toxicity in mice. *J Ayurveda Integr Med*. 2015;6(3):181-6.

58. Rasool M SE, Lavanya K, Nithya P. Therapeutic Effect of Indian Ayurvedic Herbal Formulation Triphala on Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice. *J pharmacol toxicol*. 2007;2(8):725-31.

59. Srikumar R, Jeya Parthasarathy N, Sheela Devi R. Immunomodulatory activity of triphala on neutrophil functions. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(8):1398-403.

60. Sandhya T, Lathika KM, Pandey BN, Mishra KP. Potential of traditional ayurvedic formulation, Triphala, as a novel anticancer drug. *Cancer Lett*. 2006;231(2):206-14.

61. Bag A, Bhattacharyya SK, Chattopadhyay RR. The development of *Terminalia chebula* Retz. (Combretaceae) in clinical research. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(3):244-52.

62. พร้อมจิต ทรัพย์, วงศ์สถิต ฉั่วกุล, ประธานธรรารักษ์ ส. สารานุกรมสมุนไพร เล่ม 1 สมุนไพรสวนสิริรุกขชาติ. 4 ed. กรุงเทพฯ: อัมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด; 2548.
63. Cheng HY, Lin TC, Yu KH, Yang CM, Lin CC. Antioxidant and free radical scavenging activities of Terminalia chebula. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(9):1331-5.
64. Choi MK, Kim HG, Han JM, Lee JS, Lee JS, Chung SH, et al. Hepatoprotective Effect of Terminalia chebula against t-BHP-Induced Acute Liver Injury in C57/BL6 Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015.
65. Lee HS, Won NH, Kim KH, Lee H, Jun W, Lee KW. Antioxidant effects of aqueous extract of Terminalia chebula in vivo and in vitro. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(9):1639-44.
66. Lee HS, Jung SH, Yun BS, Lee KW. Isolation of chebulic acid from Terminalia chebula Retz. and its antioxidant effect in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol.* 2007;81(3):211-8.
67. Suchalatha S, Srinivasulu C, Devi S. Antioxidant activity of ethanolic extract of Terminalia chebula fruit against isoproterenol-induced oxidative stress in rats. *Indian J Biochem Biophys.* 2005;42(4):246-9.
68. Huang YN, Zhao DD, Gao B, Zhong K, Zhu RX, Zhang Y, et al. Anti-hyperglycemic effect of chebulagic acid from the fruits of Terminalia chebula Retz. *Int J Mol Sci.* 2012;13(5):6320-33.
69. Lee HS, Koo YC, Suh HJ, Kim KY, Lee KW. Preventive effects of chebulic acid isolated from Terminalia chebula on advanced glycation endproduct-induced endothelial cell dysfunction. *J Ethnopharmacol.* 2010;131(3):567-74.
70. Yang MH, Vasquez Y, Ali Z, Khan IA, Khan SI. Constituents from Terminalia species increase PPARalpha and PPARgamma levels and stimulate glucose uptake without enhancing adipocyte differentiation. *J Ethnopharmacol.* 2013;149(2):490-8.
71. Nasiri E, Hosseinimehr SJ, Azadbakht M, Akbari J, Enayati-Fard R, Azizi S. The effect of Terminalia chebula extract vs. silver sulfadiazine on burn wounds in rats. *J Complement Integr Med.* 2015;12(2):127-35.
72. Lee HH, Paudel KR, Kim DW. Terminalia chebula Fructus Inhibits Migration and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Production of Inflammatory Mediators in RAW 264.7. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015.

73. Bag A, Kumar Bhattacharyya S, Kumar Pal N, Ranjan Chattopadhyay R. Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of Terminalia chebula fruits. *Pharm Biol.* 2013;51(12):1515-20.
74. Mathew M, Subramanian S. In vitro screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. *PLoS One.* 2014;9(1).
75. Sancheti S, Sancheti S, Um BH, Seo SY. 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose: A cholinesterase inhibitor from Terminalia chebula. *South African Journal of Botany.* 2010;76(2):285-8.
76. Chang CL, Lin CS. Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and Neuroprotective Effect of Terminalia chebula Retzius Extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012.
77. Gaire BP, Jamarkattel-Pandit N, Lee D, Song J, Kim JY, Park J, et al. Terminalia chebula extract protects OGD-R induced PC12 cell death and inhibits lps induced microglia activation. *Molecules.* 2013;18(3):3529-42.
78. Kim HJ, Kim J, Kang KS, Lee KT, Yang HO. Neuroprotective Effect of Chebulagic Acid via Autophagy Induction in SH-SY5Y Cells. *Biomol Ther (Seoul).* 2014;22(4):275-81.
79. Soubir T. Antioxidant activities of some local bangladeshi fruits (Artocarpus heterophyllus, Annona squamosa, Terminalia bellirica, Syzygium samarangense, Averrhoa carambola and Olea europa). *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2007;23(2):257-61.
80. Kasabri V, Flatt PR, Abdel-Wahab YH. Terminalia bellirica stimulates the secretion and action of insulin and inhibits starch digestion and protein glycation in vitro. *Br J Nutr.* 2010;103(2):212-7.
81. Iamsaard S, Arun S, Burawat J, Sukhorum W, Wattanathorn J, Nualkaew S, et al. Phenolic contents and antioxidant capacities of Thai-Makham Pom (Phyllanthus emblica L.) aqueous extracts. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2014;15(4):405-8.
82. Tasanarong A, Kongkham S, Itharat A. Antioxidant effect of Phyllanthus emblica extract prevents contrast-induced acute kidney injury. *Bmc Complem Altern M.* 2014;14:138.

83. Dang GK, Parekar RR, Kamat SK, Scindia AM, Rege NN. Antiinflammatory activity of *Phyllanthus emblica*, *Plumbago zeylanica* and *Cyperus rotundus* in acute models of inflammation. *Phytother Res.* 2011;25(6):904-8.
84. Ansari A, Shahriar MS, Hassan MM, Das SR, Rokeya B, Haque MA, et al. *Emblica officinalis* improves glycemic status and oxidative stress in STZ induced type 2 diabetic model rats. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7(1):21-5.
85. Ngamkitidechakul C, Jaijoy K, Hansakul P, Soonthornchareonnon N, Sireeratawong S. Antitumour effects of *Phyllanthus emblica* L.: induction of cancer cell apoptosis and inhibition of in vivo tumour promotion and in vitro invasion of human cancer cells. *Phytother Res.* 2010;24(9):1405-13.
86. Yahayo W, Supabphol A, Supabphol R. Suppression of human fibrosarcoma cell metastasis by *Phyllanthus emblica* extract in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(11):6863-7.
87. Dhingra D, Joshi P, Gupta A, Chhillar R. Possible involvement of monoaminergic neurotransmission in antidepressant-like activity of *Emblica officinalis* fruits in mice. *CNS Neurosci Ther.* 2012;18(5):419-25.
88. Vasudevan M, Parle M. Effect of Anwala churna (*Emblica officinalis* GAERTN.): an ayurvedic preparation on memory deficit rats. *Yakugaku Zasshi.* 2007;127(10):1701-7.
89. Golechha M, Bhatia J, Ojha S, Arya DS. Hydroalcoholic extract of *Emblica officinalis* protects against kainic acid-induced status epilepticus in rats: evidence for an antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective intervention. *Pharm Biol.* 2011;49(11):1128-36.
90. Reddy VD, Padmavathi P, Kavitha G, Gopi S, Varadacharyulu N. *Emblica officinalis* ameliorates alcohol-induced brain mitochondrial dysfunction in rats. *J Med Food.* 2011;14(1-2):62-8.
91. Zhang Y, Zhao L, Guo X, Li C, Li H, Lou H, et al. Chemical constituents from *Phyllanthus emblica* and the cytoprotective effects on H₂O₂-induced PC12 cell injuries. *Arch Pharm Res.* 2014.
92. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem.* 1987;165(1):215-9.

93. Li P, Li Z. Neuroprotective effect of paeoniflorin on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells by modulation of reactive oxygen species and the inflammatory response. *Exp Ther Med*. 2015;9(5):1768-72.
94. Wei T, Tian W, Yan H, Shao G, Xie G. Protective effects of phillyrin on H₂O₂-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2014;34(8):1165-73.
95. Choi DJ, Kim SL, Choi JW, Park YI. Neuroprotective effects of corn silk maysin via inhibition of H₂O₂-induced apoptotic cell death in SK-N-MC cells. *Life Sci*. 2014;109(1):57-64.
96. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys*. 2009;53(2):75-100.
97. Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules*. 2010;15(11):7792-814.
98. Gutteridge JM, Halliwell B. The deoxyribose assay: an assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. *Biochem J*. 1988;253(3):932-3.
99. Russell LH, Jr., Mazzi E, Badisa RB, Zhu ZP, Agharahimi M, Millington DJ, et al. Differential cytotoxicity of triphala and its phenolic constituent gallic acid on human prostate cancer LNCap and normal cells. *Anticancer Res*. 2011;31(11):3739-45.
100. Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1472(1-2):142-52.
101. Dev S, Kumari S, Singh N, Kumar Bal S, Seth P, Mukhopadhyay CK. Role of extracellular Hydrogen peroxide in regulation of iron homeostasis genes in neuronal cells: Implication in iron accumulation. *Free Radic Biol Med*. 2015;86:78-89.
102. Mansouri MT, Naghizadeh B, Ghorbanzadeh B, Farbood Y, Sarkaki A, Bavarsad K. Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013;111:90-6.

103. Naghizadeh B, Mansouri MT. Protective Effects of Gallic Acid against Streptozotocin-induced Oxidative Damage in Rat Striatum. *Drug Res (Stuttg)*. 2015;65(10):515-20.
104. Korani MS, Farbood Y, Sarkaki A, Fathi Moghaddam H, Taghi Mansouri M. Protective effects of gallic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive deficit and brain oxidative damage in rats. *Eur J Pharmacol*. 2014;733:62-7.
105. Hajipour S, Sarkaki A, Farbood Y, Eidi A, Mortazavi P, Valizadeh Z. Effect of Gallic Acid on Dementia Type of Alzheimer Disease in Rats: Electrophysiological and Histological Studies. *Basic Clin Neurosci*. 2016;7(2):97-106.
106. Mansouri MT, Farbood Y, Sameri MJ, Sarkaki A, Naghizadeh B, Rafeirad M. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Food Chem*. 2013;138(2-3):1028-33.
107. Farbood Y, Sarkaki A, Hashemi S, Mansouri MT, Dianat M. The effects of gallic acid on pain and memory following transient global ischemia/reperfusion in Wistar rats. *Avicenna J Phytomed*. 2013;3(4):329-40.
108. Andjelkovic M, Van Camp J, De Meulenaer B, Depaemelaere G, Socaciu C, Verloo M, et al. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem*. 2006;98(1):23-31.
109. Sarkar R, Hazra B, Mandal N. Reducing power and iron chelating property of *Terminalia chebula* (Retz.) alleviates iron induced liver toxicity in mice. *Bmc Complem Altern M*. 2012;12.
110. Sarkar R, Hazra B, Mandal N. Amelioration of iron overload-induced liver toxicity by a potent antioxidant and iron chelator, *Emblica officinalis* Gaertn. *Toxicol Ind Health*. 2015;31(7):656-69.
111. Khokhar S, Apenten RKO. Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chem*. 2003;81(1):133-40.
112. Sun J, Li YZ, Ding YH, Wang J, Geng J, Yang H, et al. Neuroprotective effects of gallic acid against hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial dysfunctions in vitro and cerebral ischemia/reperfusion injury in vivo. *Brain Res*. 2014;1589:126-39.

113. Mahesh R, Bhuvana S, Begum VM. Effect of Terminalia chebula aqueous extract on oxidative stress and antioxidant status in the liver and kidney of young and aged rats. *Cell Biochem Funct.* 2009;27(6):358-63.
114. Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev.* 2005;4(2):288-314.
115. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 2000;62(6):649-71.
116. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006;97(6):1634-58.
117. Chen KH, Lin BR, Chien CT, Ho CH. Emblica officinalis Gaertn. attenuates N-nitrosodiethylamine-induced apoptosis, autophagy, and inflammation in rat livers. *J Med Food.* 2011;14(7-8):746-55.
118. Thenmozhi AJ, Dhivyabharathi M, Manivasagam T, Essa MM. Tannoid principles of Emblica officinalis attenuated aluminium chloride induced apoptosis by suppressing oxidative stress and tau pathology via Akt/GSK-3 betasignaling pathway. *J Ethnopharmacol.* 2016.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

1. BCA = bicinchoninic acid
2. CAT = catalase
3. DCF = 2',7'-dichlorofluorescein
4. DFO = desferoxamine
5. DMSO = dimethyl sulfoxide
6. DNP = 2,4-dinitrophenyl
7. DNPH = 2,4-Dinitrophenylhydrazine
8. FAC = ferric ammonium citrate
9. GdmCl = guanidine hydrochloride
10. GPx1 = glutathione peroxidase 1
11. IC₅₀ = half maximal inhibitory concentration
12. M = molar
13. mM = millimolar
14. μ M = micromolar
15. ml = milliliter
16. μ l = microliter
17. mg = milligram
18. μ g = microgram
19. MDA = malondialdehyde
20. MEM/EBSS = Minimal Essential Medium with Earle's
21. MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
22. N = normality
23. OH⁻ = hydroxyl radical
24. qPCR = quantitative polymerase chain reaction

25. ROS = reactive oxygen species
26. RPM = revolutions per minute
27. RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction
28. SEM = standard error of mean
29. SOD1 = superoxide dismutase 1
30. TBA = thiobarbituric acid
31. TCA = trichloroacetic acid
32. v/v = volume by volume
33. w/v = weight by volume



ภาคผนวก ข

1. Stock reagent สำหรับ deoxyribose assay

- 1) 33.6 mM Deoxyribose
 - Deoxyribose 450.7 mg
 - dH₂O 100 ml

- 2) 2N Hydrochloric acid (HCl)
 - conc. HCl 4.106 ml
 - dH₂O 6.25 ml

- 3) 0.1 M Ferric chloride (FeCl₃)
 - Solid FeCl₃ 8.11 g
 - 2N HCl 25 ml
 - dH₂O 475 ml

- 4) 1.2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
 - EDTA 35.1 mg
 - dH₂O 100 ml

- 5) 25% Potassium hydroxide (KOH)
 - KOH 2.5 g
 - dH₂O 10 ml

- 6) 120 mM Phosphate buffer
 - Potassium phosphate monobasic 1.63 g
 - dH₂O 100 ml
 - ปรับ pH ด้วย 25% KOH (pH 7.4)

2. สารเคมีสำหรับ deoxyribose assay

- 1) 50 mM NaOH
 - NaOH 100 mg
 - dH₂O 50 ml

- 2) 1% w/v Thiobarbituric acid (TBA)
 - TBA 250 mg
 - 50 mM NaOH 25 ml
 - เขย่าด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- 3) 2.8% w/v Trichloroacetic acid (TCA)
 - 100% w/v TCA 1.4 ml
 - dH₂O 50 ml

- 4) 300 μM FeCl₃
 - 0.1 M FeCl₃ 150 μl
 - dH₂O 50 ml

- 5) 12 mM ascorbic acid
 - L-ascorbic acid 10.5 mg
 - dH₂O 50 ml

- 6) 33.6 mM Hydrogen peroxide (H₂O₂)
 - 30% w/v H₂O₂ 33.5 μl
 - dH₂O 10 ml

3. สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

1) Minimal Essential Medium with Earle's (MEM/EBSS)

- MEM/EBSS	9.5	g
- Sodium bicarbonate	2.2	g
- HEPES buffer	10	ml
- Penicillin	10	ml
- dH ₂ O	1000	ml



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

Name	Miss Supamas Charucharana
Date of birth	1th October 1988
Nationality	Thai
Email	spiinzch@gmail.com
Contact Address	Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330
Education	2007-2010 Bachelor of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand