

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

กลไกการส่งสัญญาณเซลล์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายและสารออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการสูญเสีย  
ความจำในหนูชราเพศเมีย

Signaling mechanism of *Celastrus paniculatus* seed extract and its active compound-  
inhibited memory impairment in aged female rat

หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร.ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์

คณะสหเวชศาสตร์

รหัสโครงการ (AHS3/2562)

ผู้ร่วมวิจัย

รศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2562

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มิถุนายน 2563

**หัวข้อวิจัย** กลไกการส่งสัญญาณเซลล์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายและสารออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการสูญเสียความจำในหนูชราเพศเมีย

**ชื่อผู้วิจัย** รศ.ดร.ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อน

**หน่วยงาน** คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

**ปีงบประมาณ** 2562

### บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแสดงให้เห็นผลของการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายแบบสกัดหยาบต่อการบำรุงความจำในหนูชราเพศเมีย ผ่านวิถี mTOR และฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด SH-SY5Y ทำการทดสอบความจำโดยวิธี Morris Water Maze ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน mTOR ในเนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ด้วยวิธี Western blot และศึกษาค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายตลอดจนฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทด้วยวิธี MTT assay ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y

ผลการวิจัยพบว่าการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเป็นเวลา 14 วัน มีฤทธิ์บำรุงความจำโดยลดการใช้เวลาในการหา platform ที่ซ่อนอยู่ในน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเป็นเวลา 14 วัน เพิ่มการแสดงออกของ mTOR ในสมองส่วน hippocampus ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้ยังทำการศึกษาฤทธิ์ของกระทงลายในเซลล์เพาะเลี้ยง ชนิด SH-SY5Y พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และยังเพิ่มค่าการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 10 ug/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์บำรุงความจำและเพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์ประสาท

**คำสำคัญ** สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย ความจำ การมีชีวิตของเซลล์ประสาท

### Abstract

The present study demonstrated that *Celastrus Paniculatus* seed extract enhanced memory in female rat via mTOR pathway. Moreover, this research also showed neuroprotective effect of *Celastrus Paniculatus* seed extract in SH-SY5Y cell. This study used Morris Water Maze to demonstrate memory behavior, used Western blot to study the expression of mTOR protein in hippocampus. On the other hand, we also study the toxicity of *Celastrus Paniculatus* seed extract on SH-SY5Y cell.

The results showed that treatment with *Celastrus Paniculatus* seed extract for 14 days increase memory function by significant decreasing the time of finding the platform in compare to control. Moreover, *Celastrus Paniculatus* seed extract-treated rat for 14 days significantly increased mTOR expression in hippocampus compare to control group. On the other hand, the present also demonstrated the effect of *Celastrus Paniculatus* seed extract on the viability of SH-SY5Y cells. The results showed that *Celastrus Paniculatus* seed extract are non-toxic to the cell and significantly increased cell viability up to 80% after 24 hours. This study summarized that *Celastrus Paniculatus* seed extract enhanced spatial learning and memory formation as well as increased the viability of cell.

Keywords: *Celastrus Paniculatus* seed extract, Memory, Neuronal cell viability

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้คณะสหเวชศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2562  
มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่สัญญา AHS3/2562

### Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Faculty of Allied Health Sciences,  
Burapha University (Grant no. AHS3/2562)

## สารบัญ

|  | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....   | ก    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....  | ข    |
| กิตติกรรมประกาศ.....   | ค    |
| สารบัญ.....  | ง    |
| สารบัญภาพ.....   | จ    |
| บทที่ 1 บทนำ.....  |      |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....                                    | 1    |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....   | 3    |
| 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....   | 3    |
| 1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....   | 3    |
| 1.5 นิยามศัพท์.....  | 4    |
| บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง                                   |      |
| 2.1 ความจำ และภาวะความจำเสื่อมในวัยชรา.....                                | 5    |
| 2.2 กลไกการสร้างความจำระดับเซลล์ (mechanism of memory formation) .....     | 6    |
| 2.3 ฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย.....                                  | 7    |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย   |      |
| 3.1 การสกัดกระถางลาย.....  | 10   |
| 3.2 การเลี้ยงสัตว์ทดลอง .....  | 10   |
| 3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ .....   | 10   |
| 3.4 ทำการทดสอบพฤติกรรมการจำได้ของหนูทดลอง ด้วยวิธี Morris Water Maze (MWM) | 10   |
| 3.5 Western blot analysis .....  | 11   |
| 3.6 การวัดการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay .....                       | 11   |
| 3.7 วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล .....                               | 11   |
| 3.8 ระยะเวลาการวิจัย .....   | 11   |
| บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล                                   |      |
| 4.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....  | 12   |
| 4.2 อภิปรายผล.....   | 16   |
| บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ  |      |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ .....                                    | 19   |
| บรรณานุกรม.....  | 20   |
| ภาคผนวก  |      |

## สารบัญภาพ

|  | หน้า |
|--|------|
| ภาพที่ 2-1: ภาพของผลกระทงลาย หรือกระทงลาย หรือหมากแตก.....   | 8    |
| ภาพที่ 4-1: แสดงระยะเวลาในการหาแทนพิกได้น้ำ (escape latency) หลังจากการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย.....                     | 12   |
| ภาพที่ 4-2: การแสดงออกของ mTOR ในสมองส่วน hippocampus ในหนูที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย.....                           | 13   |
| ภาพที่ 4-3: กราฟแท่งแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย (CP (SE)) ที่เวลาแตกต่างกัน..... | 14   |
| ภาพที่ 4-4: แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย (CP(SE))                                 | 15   |
| ภาพที่ 4-5: แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารพิษ MPP+ และได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย.....      | 16   |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ภาวะความจำเสื่อมที่พบในผู้สูงอายุมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปัจจุบันคิดเป็นร้อยละ 20 ของประชากรที่อายุ 65-75 ปี และร้อยละ 40 ของประชากรอายุ 85 ปีขึ้นไป (1,4,5) ความจำเสื่อมเกิดจากความเสื่อมถอยของกระบวนการสร้างความจำในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ซึ่งใช้กลูตาเมตเป็นสารสื่อประสาท และมีตัวรับ (receptors) ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) และ N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor (18,19) ซึ่งในภาวะปกติของการสร้างความจำเริ่มต้นจาก AMPA receptor เปิดออกและยอมให้โซเดียม ( $\text{Na}^+$ ) ผ่านเข้าสู่ postsynaptic neuron ในขณะที่ NMDA receptor ถูกปิดกั้นด้วยแมกนีเซียมไอออนจึงไม่ยอมให้ประจุใด ๆ ไหลผ่าน แต่เมื่อ  $\text{Na}^+$  ไหลผ่านเข้าเซลล์มากจนเพิ่มศักย์ไฟฟ้าของ postsynaptic membrane ส่งผลให้แมกนีเซียมไอออนในช่องของ NMDA receptor หลุดออก การเปิดช่องของตัวรับชนิดนี้ไม่เพียงแต่ยอมให้  $\text{Na}^+$  ไหลผ่านได้ แต่ยังยอมให้  $\text{Ca}^{2+}$  ผ่านเข้าสู่ postsynaptic neuron ได้อีกด้วย (28) โดยการเข้ามาของ  $\text{Ca}^{2+}$  เป็นสาเหตุสำคัญที่กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เรียกว่า long-term potentiation (LTP) ของ hippocampus และถือเป็น basic cellular mechanisms ของการเรียนรู้และการสร้างความจำที่มีการศึกษากันมากที่สุดอีกด้วย (25-27) งานวิจัยจำนวนมากรายงานว่า AMPA receptor มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการเกิด LTP โดยเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการแสดงให้เห็นว่าหากมีการกระตุ้นกระบวนการ exocytosis ของ AMPA receptor จะเหนี่ยวนำให้เกิด LTP ด้วย ในทางกลับกันหากยับยั้ง exocytosis ของ AMPA receptor จะยับยั้งการเกิด LTP ถึงแม้ว่าจะถูกกระตุ้นด้วยศักย์ไฟฟ้าความถี่สูงก็ตาม (26) ใน hippocampus พบ AMPA receptor 4 subunits คือ GluA1-4 (19) โดย GluA1 มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการเกิด LTP และ synaptic plasticity (34) หากมีการทำลายยีน GluA1 (GluA1 knockout) จะสูญเสีย LTP ใน hippocampus บ่งชี้ว่า GluA1 เป็นกลไกสำคัญในการเกิด LTP และการสร้างความจำ (21) ในระหว่างกระบวนการ exocytosis ของ AMPA receptor ต้องการการเติมหมู่ phosphate บน GluA1 ในตำแหน่ง Ser831 ดังนั้นหากพบว่าการแสดงออกของ phos-Ser831 สามารถบ่งชี้ได้ว่า มีการเกิด exocytosis ของ AMPA receptor ซึ่งนำไปสู่การเกิด LTP ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กลไกการเรียนรู้และการสร้างความจำ

การศึกษาทางระบาดวิทยารายงานว่า ภาวะความจำเสื่อมพบในผู้สูงอายุเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ถึง 1.5 เท่า (12,45) และยังพบว่าในเพศหญิงจะมีภาวะความจำเสื่อมเร็วกว่าเพศชายด้วย (12) โดยในปัจจุบันทราบกันดีว่าเป็นผลมาจากฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ซึ่งปกติมีหน้าที่ส่งเสริมกระบวนการสร้างความจำในสมอง ผ่านการเพิ่มขนาดของค่าศักย์ไฟฟ้าชนิด LTP (46) กระตุ้นกระบวนการ synaptic plasticity ผ่านการแสดงออกของ synaptic proteins (13-16) และ glutamate receptors (46) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของ synapse และยังมีฤทธิ์ปกป้องและชะลอการเสื่อมของเซลล์

ประสาทอีกด้วย ดังนั้นเมื่อเข้าสู่วัยชราของเพศหญิงซึ่งอยู่ในภาวะขาด estrogen จึงส่งผลให้เกิดการหลงลืมจนกระทั่งสูญเสียความจำในที่สุด และเป็นที่มาของการให้ estrogen ทดแทนในผู้ป่วยที่มีการสูญเสียความจำจากความชรา อย่างไรก็ตามการให้ estrogen มีความเสี่ยงของโรคมะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่ (16) จึงมีข้อจำกัดในการนำ estrogen หรือแม้แต่สารที่ออกฤทธิ์คล้ายคลึงมาประยุกต์ใช้ นำไปสู่โจทย์วิจัยใหม่ที่มุ่งเน้นการหาผลิตภัณฑ์ที่ใช้รักษาภาวะความจำเสื่อมได้โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อไป

กระทงลาย (*Celastrus paniculata*) เป็นไม้เถาเนื้อแข็งขนาดใหญ่มีความสูงของต้นประมาณ 3-10 เมตร เปลือกลำต้นเป็นสีน้ำตาลปนสีเทา เมล็ดแก่มีสีน้ำตาลแดง มีรสขม (2-3) มีสรรพคุณทางยาหลากหลายกล่าวคือ มีการนำไปใช้รักษาโรคทางระบบประสาทและกล้ามเนื้อ ได้แก่ rheumatism โรคเก๊าท์ อัมพาต arthritis และการอักเสบของผิวหนัง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของความทรงจำ (10,36) โดยมีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการให้สารสกัดเมล็ดกระทงลายในหนูทดลอง เพิ่มการเรียนรู้และความจำได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยทำการทดสอบความจำด้วยวิธี elevated plus maze และ passive avoidance test (36) อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบความจำดังกล่าวเป็นการทดสอบการเรียนรู้และความจำได้แบบทั่วไป ไม่ใช่ความจำที่เฉพาะเจาะจงต่อการทำงานของสมองส่วน hippocampus (6-7,11) นอกจากนี้การทดลองดังกล่าวยังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกระทงลายมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งมีบทบาทสลาย acetylcholine ส่งผลให้มีปริมาณ acetylcholine ในสมองต่ำ ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเรียนรู้และความจำเสื่อมถอย แต่ไม่ใช่สาเหตุและกลไกหลักของการสูญเสียความจำ (24) ต่อมาในปี 2005 มีงานวิจัยเปิดเผยว่าการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายในหนูแรท ด้วยการฉีดเข้าทางช่องท้องที่ความเข้มข้น 400 และ 600 mg/kg เป็นเวลา 14 วันหลังจากการเหนี่ยวนำให้อยู่ในภาวะเครียดเรื้อรังด้วยการขังลดการสูญเสียความจำได้จากการทดสอบด้วยวิธี elevated plus maze (9) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของกระทงลายต่อ LTP และ synaptic plasticity ซึ่งถือเป็น basic cellular mechanisms ของการเรียนรู้และการสร้างความจำที่สำคัญ จึงไม่สามารถอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระทงลายต่อกลไกการสร้างความจำใน hippocampus ได้ เนื่องจากคุณสมบัติและฤทธิ์ทางยาของกระทงลาย จึงเป็นที่สนใจในปัจจุบันเป็นอย่างยิ่งและนำไปสู่การวิเคราะห์หาองค์ประกอบสำคัญเชิงเคมีในสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายด้วยวิธี Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ได้แก่ dihydro- $\beta$ -agarofuran, palmitic acid, phytol, eucric acid, trans-beta copaene, และ linalool (8) โดยมีการรายงานว่ามีสารที่มีปริมาณมากที่สุดจากการสกัดเมล็ดกระทงลาย (48) แต่ยังไม่มีการศึกษาผลต่อการสร้างความจำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลและกลไกการทำงานของระดับเซลล์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย ต่อการยับยั้งภาวะความจำเสื่อม ผ่านการแสดงออกของ GluA1, synaptic protein, ตลอดจนโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น signaling cascade (PI-3K-Akt) ในหนูแรทเพศเมียชรา



## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายต่อการบำรุงความจำในหนูแรทเพศเมีย
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายต่อการแสดงออกของ mTOR ในสมองส่วน hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย
3. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาท เพาะเลี้ยง SH-SY5Y
4. เพื่อศึกษาผลของเวลาการให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาท เพาะเลี้ยง SH-SY5Y
5. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายในการป้องกันพิษของ MPP+ ในเซลล์ประสาท เพาะเลี้ยง SH-SY5Y

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หลังจากเสร็จสิ้นงานวิจัยชิ้นนี้ ผู้วิจัยคาดว่าจะทำให้ทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ซึ่งมีผลบำรุงความจำในหนูแรทเพศเมีย นอกจากนี้ยังทำให้เข้าใจกลไกการทำงานของสารออกฤทธิ์ภายในสมองส่วน hippocampus ซึ่งมีหน้าที่หลักในการสร้างการเรียนรู้และความจำ ตลอดจนได้ทราบถึงความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายอีกด้วย ดังนั้นหากมีการพัฒนาสารสกัดไปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อการนำไปใช้ป้องกันหรือรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ จะเป็นการสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคในการใช้ตัวยาสมนไพรนี้ต่อไป

นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้ยังมีประโยชน์ต่อหน่วยงานเอกชน ที่สนใจจะผลิตอาหารเสริมที่มีฤทธิ์บำรุงสมอง กระตุ้นการเรียนรู้และความจำ ตลอดจนป้องกันภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุโดยเฉพาะเพศหญิงซึ่งถือเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงที่สุด นับเป็นชิ้นงานต้นแบบที่พร้อมจะนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ต่อไป

## 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษาผลสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ต่อการบำรุงความจำเสื่อม และการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ และระดับโมเลกุลในสมองส่วน hippocampus ที่มีความสอดคล้องกับกระบวนการสร้างความจำในหนูแรทเพศเมีย

### 1.5 นิยามศัพท์

|                  |   |
|------------------|---|
| AMPA             | $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4- propionic acid |
| NMDA             | N-methyl-D-aspartate  |
| Na <sup>+</sup>  | Sodium  |
| Ca <sup>2+</sup> | Calcium   |
| LTP              | Long-term potentiation  |
| Ser              | Serine  |
| mg/kg            | Milligram per kilogram  |
| CG-MS            | Gas chromatography–mass spectrometry                          |
| PI-3K-Akt        | Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Akt                      |
| PSD-95           | Postsynaptic density-95                                       |
| LDH              | Lactate dehydrogenase   |
| ROS              | Reactive oxygen species                                       |
| CaM              | Calmodulin  |

## บทที่ 2

### วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ความจำ และภาวะความจำเสื่อมในวัยชรา

ความจำ หมายถึง ความสามารถของสมองในการเก็บข้อมูลและระลึกถึงข้อมูลได้เมื่อต้องการใช้งาน ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเรียนรู้และการดำรงชีวิตประจำวันในทุกช่วงวัยตั้งแต่เด็กถึงวัยชรา โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดตามระยะเวลาของการคงอยู่ในสมอง ได้แก่ sensory memory, ความจำระยะสั้น (short-term memory), และ ความจำระยะยาว (long-term memory) โดยความทรงจำระยะยาว เกิดจากการทบทวนความจำระยะสั้นจนกระทั่งมีการเพิ่มขึ้นของศักย์ไฟฟ้าและคงอยู่เป็นเวลานาน ที่เรียกว่า long term potentiation (LTP) ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระหว่างเซลล์ประสาทแบบถาวร ซึ่งจะสามารถจดจำข้อมูลต่างๆ ได้นานเป็น วัน เดือน ปี หรือตลอดชีวิต ถือเป็นกระบวนการรวบรวมหน่วยความจำให้มีความมั่นคงโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงข้อมูลเดิมที่ได้จดจำไปแล้ว (28) การสร้างความจำระยะยาวเกิดขึ้นที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) จากการค้นพบครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่า “คนไข้สูญเสีย recent memory เกิดขึ้นหลังจาก bilateral หรือ unilateral hippocampal removal” (22) บ่งชี้ว่า hippocampus คือบริเวณสำคัญของสมองในการสร้างความจำโดยเฉพาะความจำชนิด spatial (spatial memory) ซึ่งเป็นการจดจำเหตุการณ์ เวลา และสถานที่ (23) หากมีการสูญเสีย spatial memory จะไม่สามารถจดจำตำแหน่งและเส้นทางได้ (16, 21) ความจำชนิดนี้เป็นที่นิยมทำการวิจัยเพราะนอกจากจะสะท้อนถึงการทำงานของสมองส่วน hippocampus แล้วยังมีเทคนิคในการตรวจสอบ spatial memory ที่มีความถูกต้องแม่นยำและเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางในวงการวิจัย ได้แก่ Morris water maze อีกด้วย (16, 21-22, 30) ดังที่ได้กล่าวไปแล้วว่าความจำได้ มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตตลอดชีวิต ดังนั้นการสูญเสียความจำ (memory impairment) หรือมีความผิดปกติเกี่ยวกับการสร้างความจำ จึงเป็นปัญหาสำคัญที่กระทบต่อการดำรงชีวิตของทั้งผู้ป่วยและบุคคลรอบข้าง การสูญเสียความจำพบมากในผู้สูงอายุ โดยคิดเป็นร้อยละ 20 ของประชากรที่อายุ 65-75 ปี และร้อยละ 40 ของประชากรอายุ 85 ปีขึ้นไป (1,4,5,45) นอกจากนี้การศึกษาทางระบาดวิทยาในประเทศไทยรายงานว่า ความชุกของภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุคิดเป็นร้อยละ 12.4 โดยพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชายถึง 1.5 เท่าและยังพบว่าในเพศหญิงจะมีภาวะความจำเสื่อมเร็วกว่าเพศชายด้วย (12) โดยในปัจจุบันทราบกันดีว่าเป็นผลมาจากอิทธิพลของฮอร์โมนเพศหญิงชนิด เอสโตรเจน (estrogen) ซึ่งในภาวะปกติมีหน้าที่สำคัญในการส่งเสริมกระบวนการสร้างความจำในสมอง ผ่านการเพิ่มขนาดของศักย์ไฟฟ้าชนิด long-term potential (LTP) (20,46) กระตุ้นกระบวนการ synaptic plasticity ผ่านการแสดงออกของ synaptic proteins (13-16) และ glutamate receptors (46) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของ synapse (39,41,43,47) มีการรายงานว่าทำให้ estrogen เพิ่มจำนวน synapse ได้ในหนูทดลองเพศเมีย (12,13,46) นอกจากนี้ estrogen ยังมีฤทธิ์ปกป้องและชะลอการเสื่อมของเซลล์ประสาทอีกด้วย (14, 16) ดังนั้นเมื่อเข้าสู่วัยชราของเพศหญิงซึ่งอยู่ในภาวะที่ขาด estrogen จึงส่งผลโดยตรงต่อระบบความจำ กล่าวคือ เกิดภาวะหลงลืมจนกระทั่งสูญเสียความจำในที่สุด (45) โดยมีงานวิจัยจำนวนมากได้แสดงให้เห็น

ว่าหนูทดลองเพศเมียวัยซราสูญเสีย spatial memory ตั้งแต่อายุ 19 เดือน และเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสตั้งแต่ 15 เดือน (16, 44) และเกิดเป็นที่มาของการให้ estrogen ทดแทนในผู้ป่วยที่มีการสูญเสียความจำจากภาวะชรา หรือภาวะหมดประจำเดือนนั่นเอง อย่างไรก็ตาม การให้ estrogen ส่งผลให้มีความเสี่ยงของโรคมะเร็งเต้านม และมะเร็งรังไข่เพิ่มขึ้น (38) จึงมีข้อจำกัดในการนำฮอร์โมน estrogen หรือแม้แต่สารที่ออกฤทธิ์คล้ายคลึงมาประยุกต์ใช้ นำไปสู่โจทย์วิจัยใหม่ที่มุ่งเน้นการหาผลิตภัณฑ์ที่สามารถใช้รักษาภาวะความจำเสื่อมได้โดยไม่มีผลร้ายข้างเคียงต่อไป

## 2.2 กลไกการสร้างความจำระดับเซลล์ (mechanism of memory formation)

กลไกการสร้างความจำ อาศัยการทำงานของสมองส่วน hippocampus ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบลิมบิก วางตัวอยู่ทางด้านในของสมองส่วน temporal lobe ภายในประกอบด้วยโครงสร้างย่อยคือ dentate gyrus และ Cornu Ammonis (CA)1-4 เชื่อมติดกันเป็นวงจร โดย dentate gyrus จะทำหน้าที่รับสัญญาณประสาท แล้วส่งต่อไปกับ CA3 CA2 และ CA1 ตามลำดับ (28) เซลล์ประสาทของสมองส่วน hippocampus มีการติดต่อกันโดยใช้กลูตาเมต (glutamate) เป็นสารสื่อประสาท โดยเริ่มจากการส่งสัญญาณในระยะแรก เมื่อ action potential มาถึงบริเวณ presynaptic neuron กระตุ้นการทำงานของ voltage gate calcium channels (VGCCs) จนทำให้แคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$ ) ไหลเข้าสู่ presynaptic terminal และกระตุ้นให้มีการปล่อย glutamate เข้าสู่ synaptic cleft จากนั้น glutamate จะเข้าจับกับ glutamate receptors ทั้งชนิด  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) และ N-methyl-D-aspartate (NMDA) ที่อยู่บนผิวของ postsynaptic cell โดยระยะแรกตัวรับชนิด AMPA จะเปิดออกและยอมให้โซเดียมผ่านเข้าสู่ postsynaptic neuron (dendrite spine) ในขณะที่ตัวรับชนิด NMDA ถูกปิดกั้นด้วยแมกนีเซียมไอออนจึงไม่ยอมให้ประจุใด ๆ ไหลผ่าน แต่เมื่อโซเดียมไอออนไหลผ่านเข้าเซลล์มากจนเกิด depolarization ของ postsynaptic membrane และทำให้ค่าเพิ่มศักย์ไฟฟ้าของ postsynaptic neuron เพิ่มขึ้นเรียกว่า excitatory postsynaptic potential (EPSP) ส่งผลให้แมกนีเซียมไอออนในช่องของตัวรับชนิด NMDA หลุดออก การเปิดช่องของตัวรับชนิดนี้ไม่เพียงแต่ยอมให้  $Na^+$  ไหลผ่านได้ แต่ยังยอมให้  $Ca^{2+}$  ผ่านเข้าสู่ dendritic spine ได้อีกด้วย โดยการเข้ามาของ  $Ca^{2+}$  กระตุ้นกระบวนการ LTP ของ hippocampal glutamatergic synapses ซึ่งถือเป็น basic cellular mechanisms ของการเรียนรู้และการสร้างควมจำที่มีการศึกษากันมากที่สุดอีกด้วย (28, 40-43)

มีงานวิจัยจำนวนมากรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงทางคุณสมบัติของตัวรับชนิด AMPA ถือเป็น molecular mechanisms ของกระบวนการ long-term potentiation (LTP) โดยเมื่อเร็วๆ นี้มีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงจำนวนของตัวรับชนิด AMPA บน postsynaptic membrane หรือที่เรียกว่า AMPA receptor insertion มีความสำคัญต่อกระบวนการ synaptic plasticity และเป็น primary mechanisms ของการเกิด LTP อีกด้วย (15) โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ AMPAR บน postsynaptic membrane นั้นอาศัยกระบวนการ exocytosis, endocytosis, lateral movement และการจับ (trapping) บน postsynaptic membrane และหากมีการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ AMPAR exocytosis จะกระตุ้นการเกิด LTP (26) ตัวรับชนิด AMPA ใน hippocampus มี 4 subunits

คือ GluA1-4 (19) โดยมีการเข้าคู่กันเป็น hetero-tetramer และคู่ที่พบมากคือการจับกันของ GluA1/GluA2 hetero-tetramer และ GluA2/GluA3 hetero-tetramer (19) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าหากมีการทำลายยีน GluA1 (GluA1 knockout) จะสูญเสีย LTP ระหว่าง CA3 และ CA1 (21) บ่งชี้ว่า GluA1 มีความสำคัญมากต่อการเกิด LTP ใน hippocampus ในระหว่างกระบวนการ exocytosis ของ AMPA receptor ต้องการการเติมหมู่ phosphate บน GluA1 ในตำแหน่ง Ser 831 (21,25) ดังนั้น หากพบว่ามีการแสดงออกของ phos-Ser831 สามารถบ่งชี้ได้ว่า มีการเกิด exocytosis ของตัวรับชนิด AMPA ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญของ LTP ซึ่งเป็น basic cellular mechanisms ของการเรียนรู้และการสร้างความจำ (29, 31)

นอกจากนี้อิทธิพลของ  $Ca^{2+}$  ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ได้ โดยอาศัยการเริ่มต้นด้วยการกระตุ้น Calcium/calmodulin ( $Ca^{2+}/CaM$ ) dependent protein kinase II (CaMKII) และมีการส่งต่อไปเรื่อยๆ จนกระทั่งเกิดการสังเคราะห์โปรตีนชนิดใหม่ที่เป็นต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและจำนวนของ synapse ได้แก่ activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) และ postsynaptic density (PSD)-95 ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างที่มีความเกี่ยวข้องโดยตรงต่อการเพิ่มขนาด เพิ่มจำนวน และเพิ่มความแข็งแรงของ synapse อย่างถาวร (13, 17-18, 23) เรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า synaptic plasticity นับเป็นระยะที่สองของการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ของกระบวนการสร้างความจำ หากยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน Arc และ PSD-95 จะทำให้จำนวน dendritic spine ลดลง และ สูญเสียการคงสภาพ ของ dendritic spine ตลอดจนมีผลลบกับความจำและการเรียนรู้ของสัตว์ทดลองอีกด้วย ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า Arc และ PSD-95 คือโปรตีนบน dendritic spine ที่มีการสร้างความจำ (site of memory formation) ในสมอง จึงเป็นที่มาของงานวิจัยจำนวนมากในปัจจุบันที่ประเมินระดับของการจำได้จากปริมาณของ Arc และ PSD-95 ตลอดจนจำนวนของ dendritic spine ในสมองโดยเฉพาะสมองส่วน hippocampus (22, 25,27,29)

### 3.3 ฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย

*Celastrus paniculatus* Willd เป็นพืชในวงศ์ Celastraceae มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ คือ *Celastrus paniculatus* Willd ตระกูล Celastraceae มีขนาดเล็ก เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางซึ่งมีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย กระจายไปทั่วประเทศ เช่น มาเลเซีย, ไทย, จีน, ฟิลิปปินส์, ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของออสเตรเลีย ส่วนต่าง ๆ ของกระทงลาย เช่น รากเปลือกต้นใบและเมล็ดใช้สำหรับรักษาโรคหลายชนิดและ disorders. กระทงลายมีคุณสมบัติเป็นยาหลายอย่าง และใช้สำหรับการรักษาโรคข้ออักเสบ, โรคหอบหืด, โรคเหน็บชา, โรคหลอดเลือดอักเสบ, โรคมะเร็ง, ความเจ็บปวดของร่างกายที่เกิดจากความผิดปกติของช่องท้อง หัวใจเต้นผิดจังหวะ และกระทงลาย ยังเป็นยาบำรุงกำลังและบำรุงสมองที่ดี พืชในตระกูล *Celastrus paniculatus* Willd มีขนาดเล็กไปจนถึงขนาดกลาง ไม้ยืนต้นที่มีกิ่งเป็นรูปทรงกระบอกหรือมีริ้วเล็กน้อย หน่ออ่อนและกิ่งก้านมีใบไม้แตกแขนง ใบเรียบไม่มีขนมีความกว้างด้านล่างตรงกลางและยาวเป็นสองเท่าของความกว้าง มีสีเหลืองอมเขียว ทั้งเกสรเพศผู้และเพศเมีย carpels (unisex) ผลเป็นรูปทรงกลม, เมล็ดมีรูปทรงรีหรือรูปไข่และมีสีน้ำตาล สีแดง (2,3)



ภาพที่ 2-1 ภาพของผลกระทงลาย หรือกระทงลาย หรือหมากแตก (ชื่อวิทยาศาสตร์: *Celastrus paniculatus*; ภาษาสันสกฤต: Jyotishmati, ภาษาฮินดี: Mal-kangani, ภาษาจีน: Deng you teng) เป็นพืชในวงศ์ Celastraceae เป็นพืชที่พบในอินเดีย และในประเทศไทย เป็นไม้เลื้อย ใบเดี่ยว ดอกช่อ ออกที่ปลายกิ่งหรือซอกใบ ดอกแยกเพศ แยกต้น ดอกตัวผู้มีฐานรองดอกรูปถ้วย กลีบดอกสีเขียว ผลกลม แห้งแตก เมล็ดมีเยื่อสีน้ำตาลแดงหรือแดงสด

ในปัจจุบันมีการสนับสนุนให้เกษตรกรปลูกต้นกระทงลายในหลายพื้นที่ ได้แก่ จังหวัดมหาสารคาม ผ่านโครงการวิจัยในสถาบันวิจัยวลัยรุกขเวชวิจัยของคณะผู้วิจัยในมหาวิทยาลัยมหาสารคาม และจังหวัดเชียงใหม่ ผ่านศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ เนื่องจากกระทงลายเป็นพืชที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งต้น โดยมีสรรพคุณทางยาหลากหลาย ได้แก่ ใบ มีฤทธิ์ลดอาการท้องเดิน ช่วยรักษาโรคบิด เมล็ด ถูกนำไปใช้รักษาโรคทางระบบประสาทและกล้ามเนื้อ (neuromuscular system) ได้แก่ rheumatism โรคเก๊าท์ (gout) และ อัมพาต arthritis และการอักเสบของผิวหนัง เป็นต้น (10) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำในแง่ของสติปัญญา (intelligence) และ การเพิ่มประสิทธิภาพของความทรงจำ (sharpen memory) (36) การเพิ่มประสิทธิภาพด้านความจำมีการรายงานครั้งแรกในวารสาร “พรรณไม้พื้นบ้านอีสาน” โดยชาวบ้านใช้วิธีการนำเมล็ดมาต้มกับน้ำดื่มรับประทาน และให้ผลตอบสนองเป็นที่พึงพอใจแก่ผู้ใช้โดยให้ความรู้รู้สึกว่าสามารถจดจำสิ่งต่างๆ ได้ดี และลดความเหนื่อยล้าของสมองจากการทำงาน (3) ต่อมามีการวิจัยในประเทศอินเดีย และตีพิมพ์เผยแพร่ลงในวารสารระดับนานาชาติ ถึงผลของสารสกัดเมล็ดกระทงลายในการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองโดยทำการทดสอบความจำด้วยวิธี elevated plus maze และ passive avoidance test โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายแบบสกัดหยาบทางปาก เพิ่มการเรียนรู้และความจำได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (36) และเปรียบเทียบกับยามาตรฐานไพราซีแตม (Piracetam) ซึ่งเป็นยาที่มีคุณสมบัติเสริมสร้างกระบวนการรับรู้ของสมองซึ่งในทางคลินิกนำยามานี้มาใช้บำบัดอาการความจำเสื่อม (10) อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบความจำดังกล่าวเป็นการทดสอบการเรียนรู้และความจำได้แบบทั่วไป ไม่ใช่ความจำที่เฉพาะเจาะจงต่อการทำงานของสมองส่วน hippocampus (6-7,12

) นอกจากนี้การทดลองดังกล่าวยังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกระทงลายออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งมีบทบาทสลาย acetylcholine ใน synaptic cleft ส่งผลให้มีปริมาณ acetylcholine ในสมองต่ำ ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเรียนรู้และความจำเสื่อมถอย แต่ไม่ใช่

สาเหตุและกลไกหลักของการสูญเสียความจำ (24) ต่อมาในปี 2005 มีงานวิจัยเปิดเผยว่าการให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายในหนูแรทที่ด้วยการฉีดเข้าทางช่องท้องที่ความเข้มข้น 400 และ 600 mg/kg เป็นเวลา 14 วันหลังจากการเหนี่ยวนำให้อยู่ในภาวะ chronic stressed ด้วยการชั่ง ลดการสูญเสียความจำได้จากการทดสอบด้วยวิธี elevated plus maze (9) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของกระถางลายต่อกระบวนการ basic cellular mechanisms ของการเรียนรู้และการสร้างความจำที่สำคัญคือ LTP และ synaptic plasticity ในบริเวณสมองส่วน hippocampus ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว จึงไม่สามารถอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากกระถางลายต่อกลไกการสร้างความจำในสมองส่วน hippocampus ได้ มากไปกว่านี้ สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายยังมีคุณสมบัติเป็นสาร anti-oxidant และ anti-inflammatory กล่าวคือสามารถยับยั้งการเกิด apoptosis จากการเหนี่ยวนำด้วยสาร tertiary butyl hydroperoxide โดยการยับยั้งการผลิต ROS ยับยั้งการรั่ว ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) และการตายของเซลล์จากภาวะที่ไม่โตคอนเดรียไม่ทำงาน ในเซลล์กล้ามเนื้อเพาะเลี้ยง ชนิด C2C12 muscle cells (33) และมีรายงานว่า เป็น potent antioxidant ในสมองด้วย จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ใน กลุ่มโรคของผู้สูงอายุ อาทิเช่น neurodegenerative disorder จากผลการทดลองของ Kumar และ Gupta (2002) ซึ่งให้ สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองนั้นอาจจะเนื่องมาจากคุณสมบัติของการเป็น potent antioxidant แต่ยังไม่มีการศึกษาในปัจจุบัน เนื่องจากคุณสมบัติและฤทธิ์ทางยาของกระถางลาย จึงทำให้กระถางลายเป็นที่สนใจในปัจจุบันเป็นอย่างยิ่งและนำไปสู่การวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญเชิงเคมีในสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายด้วยวิธี Gas chromatography–mass spectrometry (CG-MS) พบสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ได้แก่ dihydro-beta-agarofuran, palmitic acid (38.61%), phytol (11.72%), euric acid (6.99%), trans-beta copaene (4.78%), linalool (3.97%) (8) ในปี 2018 มีการรายงานว่า dihydro-beta-agarofuran คือสารที่มีปริมาณมากที่สุดจากการสกัดเมล็ดกระถางลายและมีคุณสมบัติ alpha-glycosidase inhibitory แต่ยังไม่มีการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ที่แท้จริงในการเมล็ดกระถางลายต่อการกระตุ้นกลไกการสร้างความจำแต่มีการทดลองว่า high fat diet ซึ่งมีส่วนประกอบของ palmitic acid สูงนั้นมีผลยับยั้ง LTP และ synaptic plasticity ในสมองส่วน hippocampus ผ่านกระส่งสัญญาณเซลล์ของ PI-3K3-Akt-mTOR signaling pathway.

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การสกัดกระทงลาย

เมล็ดกระทงลายที่ใช้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว อ.เชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ นำเมล็ดตากให้แห้งและอบจนแห้งด้วยอุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปบดด้วยโกร่งบดยา จนละเอียด แล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ แซ่เมล็ดในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% อัตราส่วน เมล็ดกระทงลาย: เอทิลแอลกอฮอล์ = 1:2 (w/v) ทิ้งไว้ 3 วันจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง (rotary vacuum evaporator) เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในขวดแก้วสีชา จากนั้นส่งให้ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ทำการสกัดเมล็ดกระทงลายแบบ crude extract แบบ purify ซึ่งควบคุมดูแลโดยอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญในด้านการสกัดเมล็ดพืช ผศ. ดร.อนันต์ อิทธิพรชัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

#### 3.2 การเลี้ยงสัตว์ทดลอง

หนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 6 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงในสภาพแวดล้อมปิดเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มดำเนินการทดลองเพื่อให้สัตว์ทดลองปรับสภาพต่อสภาวะแวดล้อมของสถานที่เลี้ยงใหม่ จากนั้นนำมาทำการ ฉีดด้วยสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 400 mg/kg เป็นเวลา 14 วันต่อเนื่อง ทางช่องท้องก่อนนำไปทดสอบพฤติกรรมการจำได้ด้วยวิธี Morris Water Maze (MWM)

#### 3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้จากสัตว์ทดลอง คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงร่วมด้วย โดยใช้เซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y neuroblastoma ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเซลล์ประสาทที่สร้างสารสื่อประสาทชนิดโดปามีน โดยได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ศ.ดร.สุขุมล จงธรรมคุณ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล มาทำการเพาะเลี้ยงใน T-flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimum Essential Medium Eagle (MEM) ผสมกับ F12 Ham's Nutrient Mixture F12 ในอัตราส่วน 1:1 และเติม 10% fetal bovine serum (FBS), 0.5% sodium pyruvate, 0.005% non-essential amino acid และ 2% sodium pyruvate ก่อนใช้งาน โดยเซลล์เพาะเลี้ยงจะถูกเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิในสภาวะ 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37 °C หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเต็มพื้นที่ T-flask แล้ว ทำการ subculture และ plate เซลล์ลงใน 96-well plate หรือ 6-well plate เพื่อศึกษาด้วยเทคนิค MTT assay และ Western blot ตามลำดับ

#### 3.4 ทำการทดสอบพฤติกรรมการจำได้ของหนูทดลอง ด้วยวิธี Morris Water Maze (MWM)

Morris Water Maze เป็นเครื่องมือทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาทด้านการเรียนรู้และความจำ โดยทดสอบความจำที่เกี่ยวข้องกับทิศทางและสถานที่ (spatial memory) นับเป็นความจำที่มีความจำเพาะต่อการทำงานของสมองส่วน hippocampus เริ่มการทดสอบโดยปล่อยหนูทดลอง ลงในอ่าง



ทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 เซนติเมตร ความสูง 60 เซนติเมตร ความลึกของน้ำ 45 เซนติเมตร แบ่งอ่างออกเป็น 4 โซน และมีสัญลักษณ์ที่ขอบอ่าง (visual cue) ต่างกัน 3 จุด ยกเว้นจุดที่มีแท่นใต้น้ำ (platform) จะไม่มีสัญลักษณ์ ติดตั้งให้แท่นใต้น้ำมีความสูง 44 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ผิวน้ำโรยด้วย non-toxic powder เพื่อปิดแท่นน้ำระหว่างการทดลอง จากนั้นเริ่มต้นการทดลองด้วยการปล่อยหนูจากบริเวณที่มีสัญลักษณ์แล้วจับเวลาที่หนูหาแท่นใต้น้ำเจอในเวลา 60 วินาที ถ้าหาแท่นไม่เจอให้จับหนูไปวางบนแท่นเป็นเวลา 10 วินาที ทำการทดลองทุกวันเป็นเวลา 7 วัน บันทึกค่าเวลาที่ได้เป็นค่า escape latency จากนั้นเอาแท่นใต้น้ำออกแล้วปล่อยหนูจากบริเวณที่มีสัญลักษณ์เช่นเดิม จับเวลาที่หนูว่ายอยู่ในบริเวณที่เคยมีแท่นใต้น้ำ บันทึกเวลาเป็นค่า retention time

### 3.5 Western blot analysis

หลังจาก plate cell ลงใน 6-well เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว บ่มด้วยสารสกัดจากกระถางลายที่ความเข้มข้น 10 ug/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดโปรตีนโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ RIPA buffer (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, EDTA 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM, NaF 50 mM) บด (homogenized) และ lysed ด้วยการ sonication นำโปรตีนที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 10% SDS-PAGE gel จากนั้นทำการย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane และนำ membrane ไปบ่มใน 5% non-fat milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding ก่อนนำไปบ่มใน mTOR และ actin antibody ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นแช่ใน secondary antibody ที่จำเพาะ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Enhance chemiluminescent detection และการเรืองแสงลงบน X-ray film

### 3.6 การวัดการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y โดยทำการ plate เซลล์ลงใน 96-well plate ให้มีความหนาแน่นของเซลล์  $5-10 \times 10^3$  cells/well หลังจากให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายครบเวลาแล้วทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเติมสาร MTT ปริมาตร 10 ul ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ul เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% MTT และทำการผสมโดยดูดขึ้นลงเบาๆ แล้วนำเข้าตู้บ่มภายใต้อุณหภูมิ 37 C 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง จากนั้นเติม DMSO 200 ul แล้วทำการดูดขึ้นลงเบาๆ โดยระวังไม่ให้เกิดฟองเพื่อให้ผลึกแตกตัว จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

### 3.7 วิธีการประเมินผล/ สังเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means  $\pm$  SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลสองชุดจะทดสอบโดย unpaired Student's t-test ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุดจะถูกทดสอบด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey multiple comparison test ความแตกต่างทางด้านสถิติของการทดสอบต้องมีค่า  $P \leq 0.05$  ประเมินผลข้อมูลโดย Graph-Pad Prism 5.0

### 3.8 ระยะเวลาการวิจัย

งานวิจัยนี้มีระยะเวลาดำเนิน 1 ปี ตามแผน

## บทที่ 4

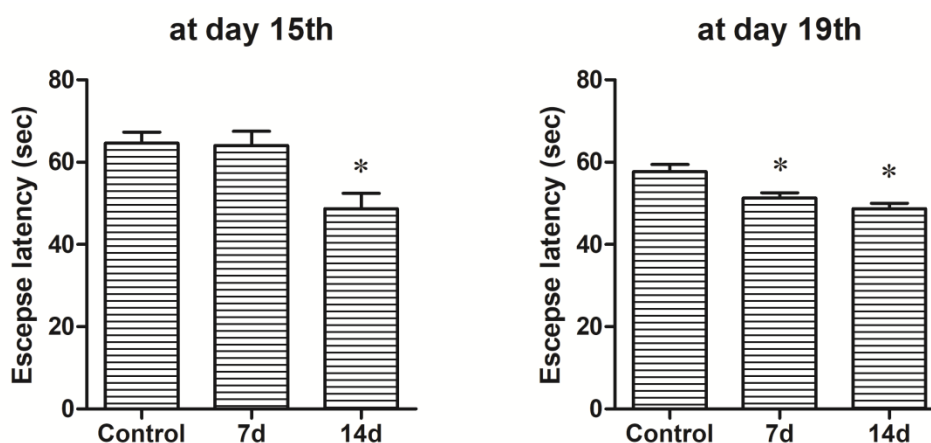
### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

งานวิจัยชิ้นนี้แสดงให้เห็นถึงผลของการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายแบบสกัดหยาบต่อการบำรุงความจำในหนูแรทเพศเมียและฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ชนิด SH-SY5Y ผ่านวิถี mTOR

#### 4.1 สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์บำรุงความจำในหนูแรทเพศเมีย

งานวิจัยชิ้นนี้แสดงให้เห็นถึงผลของการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายแบบสกัดหยาบต่อการบำรุงความจำในหนูแรทเพศเมีย โดยการฉีดสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 400 mg/kg (ละลายใน oil) เข้าทางช่องท้อง (i.p.) ของหนูแรทเพศเมีย อายุ 10 สัปดาห์ ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน หรือ 14 วัน หลังจากนั้นทำการทดสอบความจำของหนูทดลอง ด้วยวิธี Morris water maze (MWM) ซึ่งเป็นการทดสอบที่บ่งชี้ถึง spatial memory ได้เฉพาะเจาะจงมากที่สุด และมีงานวิจัยรองรับมากที่สุด โดยมีวิธีการคือใช้อ่างบรรจุน้ำเส้นผ่านศูนย์กลาง 153 เซนติเมตร ที่ระดับความลึก 60 เซนติเมตร และควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายในมีแท่นพักใต้น้ำ (hidden platform) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร อยู่ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ 2 เซนติเมตร แบ่งอ่างน้ำออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆกัน โดยวางแท่นพักบริเวณกึ่งกลางของส่วนใดส่วนหนึ่ง และติดยุสสัญลักษณ์รอบอ่างในเพื่อให้หนูได้อาศัยภาพในการจดจำตำแหน่งของแท่นพักซึ่งอยู่ใต้น้ำ แล้วทำการทดสอบ โดยแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ training, trial, และ probe trial

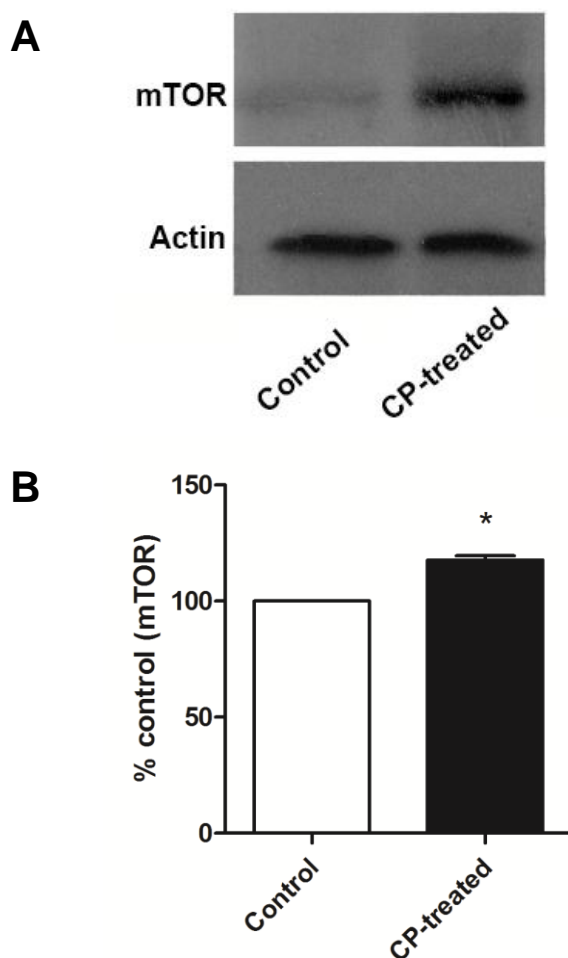
โดยผลการทดลองในช่วงของ training ของหนูทั้ง 3 กลุ่มให้ผลไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าหนูทดลองแต่ละตัวมีความสามารถในการเรียนรู้และจดจำตำแหน่งในการค้นหาแท่นพักได้ไม่แตกต่างกัน ภายหลังจากได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายปริมาณ 400 mg/kg เป็นเวลา 14 วัน หนูทดลองมีระยะเวลาเฉลี่ยในการหาแท่นพักใต้น้ำ (escape latency) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่วันที่ 16 เป็นต้นไป ส่วนหนูที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเป็นเวลา 7 วัน มีค่า escape latency ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่วันที่ 19 เท่านั้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ oil เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเป็นเวลานาน (2 สัปดาห์) มีผลเพิ่มความจำในหนูแรทเพศเมีย



ภาพที่ 4-1 แสดงระยะเวลาในการหาแทนพักได้น้ำ (escape latency) หลังจากการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 400 ug/kg เป็นเวลา 7 วัน หรือ 14 วัน โดยทดสอบที่วันที่ 15 (A) และวันที่ 19 (B) N=5, \* p<0.05

#### 4.2 สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของ mTOR ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

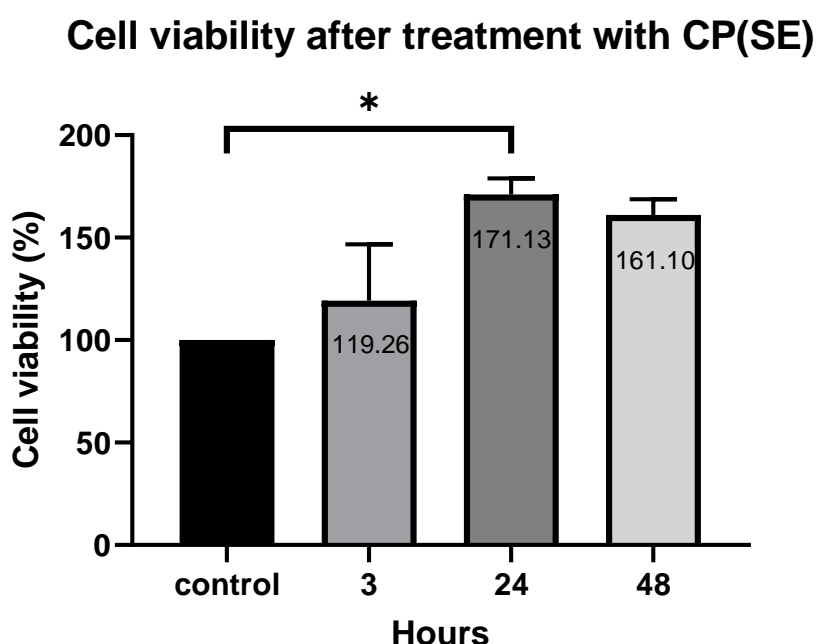
หลังจากทดสอบพฤติกรรมของหนูทดลองแล้ว นำสมองส่วน hippocampus มาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ผ่านแสดงออกของโปรตีน mammalian target of rapamycin (mTOR) ในซึ่งเป็น downstream ของวิถี PI-3K/Akt ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า mTOR มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ให้ สารสกัดจากกระทงลาย (รูปที่ 2) เนื่องจากมีข้อมูลงานวิจัยรายงานว่าการกระตุ้นวิถี mTOR มีบทบาทในการควบคุม mitochondria fission และ apoptosis โดยหาก mTOR โปรตีนถูกยับยั้งหรือมีการแสดงออกที่ลดลง นำไปสู่การยับยั้งการเกิด apoptosis บ่งชี้ว่า สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด apoptosis และเพิ่มการมีชีวิตของเซลล์ประสาทได้ด้วย



รูปที่ 4-2 การแสดงออกของ mTOR ในสมองส่วน hippocampus ในหนูที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย (CP-treated) เทียบกับหนูปกติ (Control), A แสดงแถบโปรตีน B แสดงกราฟเปรียบเทียบเป็นร้อยละ, \* p< 0.05, n=3

#### 4.3 ผลของเวลาในการให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ชนิด SH-SY5Y

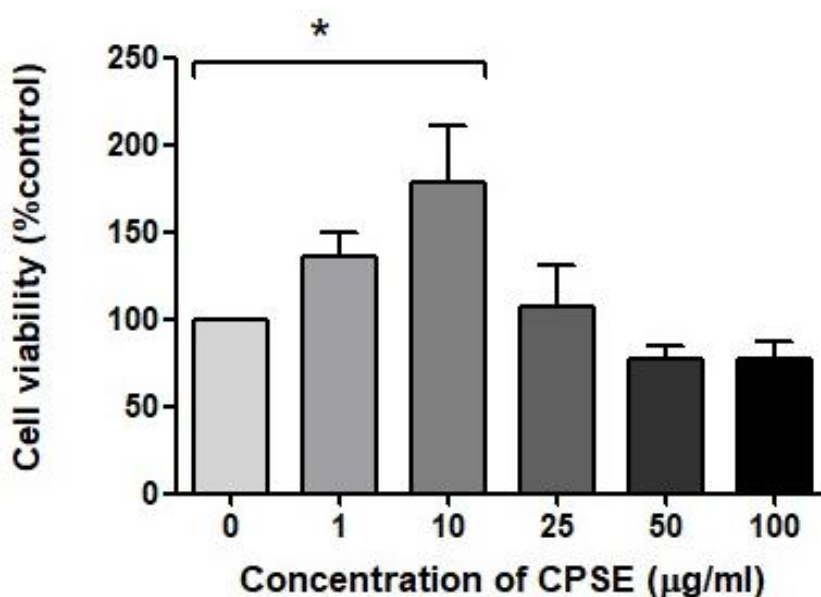
ทำการทดสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective effect) ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายในหลอดทดลองเพิ่มเติม โดยใช้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด SH-SY5Y เพาะเลี้ยงใน 96-well ทำการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 3, 24, และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปศึกษาอัตราการรอดชีวิตด้วยเทคนิค MTT เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า หลังจากให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพิ่มร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือก เวลา 24 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4-3 กราฟแท่งแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย (CP (SE)) ที่เวลาแตกต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  ที่เวลา 3, 24 และ 48 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.M), \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ )

#### 4.4 ผลของความเข้มข้นในการให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาท เพาะเลี้ยง ชนิด SH-SY5Y

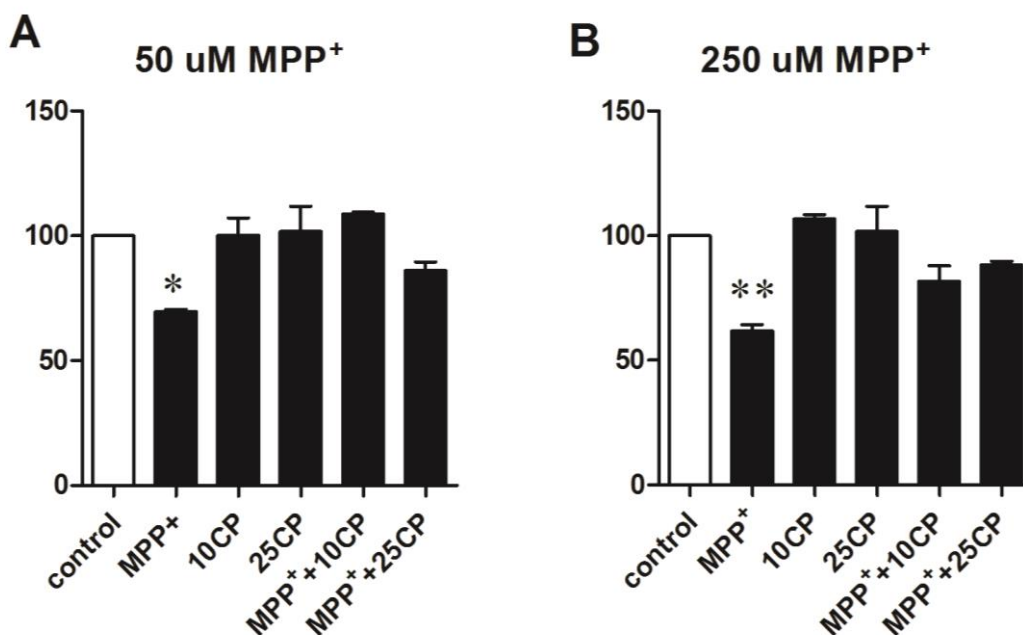
ทำการทดสอบฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาท โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายต่อการปกป้องเซลล์ประสาท โดยบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  อัตราการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการปกป้องและเพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4-4 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย (CP (SE)) โดยใช้ความเข้มข้น 0, 1, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  ที่เวลา 24 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุม (0) โดยข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.M), \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ )

#### 4.5 สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากการเหนี่ยวนำด้วยสารพิษ MPP+

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้สารพิษ MPP+ ที่ความเข้มข้น 50  $\mu$ M (A) และ 250  $\mu$ M (B) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแก่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด SH-SY5Y ส่งผลให้อัตราการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และอัตราการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย (CP) ที่ความเข้มข้น 10 และ 25  $\mu$ g/mL แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP+ ซึ่งน่าจะทำการทดลองต่อไปถึงกลไกการทำงาน และอาจจะเป็นสารที่นำไปใช้ชลอหรือช่วยรักษาโรคทางระบบประสาทได้อีกจำนวนมาก



ภาพที่ 4-5 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารพิษ MPP+ และได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย

\*\*P<0.001, \*P<0.05 vs control, n=3.

#### 4.2 อภิปรายผล

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายเป็นเวลา 14 วัน มีฤทธิ์บำรุงความจำโดยลดการใช้เวลาในการหา platform ที่ซ่อนอยู่ใต้น้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังพบว่าหนูที่ได้รับ สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายเป็นเวลา 14 วัน เพิ่มการแสดงออกของ mTOR ในสมองส่วน hippocampus แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายมีฤทธิ์เพิ่มการมีชีวิตของเซลล์ประสาทและยับยั้งการเกิด apoptosis นอกจากนี้ งานวิจัยชิ้นนี้ยังทำการศึกษากลไกของกระถางลายในเซลล์

เพาะเลี้ยง ชนิด SH-SY5Y พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และยังเพิ่มค่าการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงได้อีกด้วย

การตายของเซลล์ประสาทเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท หรือ neurodegenerative disease โดยมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการส่งสัญญาณของวิถี mTOR ในการควบคุมการแบ่งตัวและการตายของเซลล์ ที่เกิดจากการได้รับสารพิษ เป็นเหตุให้มีการตายของเซลล์ประสาทเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการลดการแสดงออกของ mTOR ในเซลล์ประสาทจึงเป็นหนึ่งในเป้าหมายหลักที่น่าสนใจในการป้องกันและรักษาโรค neurodegenerative disease งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายมีฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน mTOR ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดของกระถางลายที่ความเข้มข้น 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ ช่วยฟื้นฟูการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะ oxidative stress จากพิษของ MPP+ โดยช่วยลดการแสดงออกของ Bcl 2 ได้ ปกติ Bcl 2 เป็นโปรตีนในกลุ่มควบคุมการยับยั้งการเกิด apoptosis แต่เมื่ออยู่ในรูปที่มีการเติมฟอสเฟต จะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งโปรตีนในกลุ่มควบคุมการยับยั้งการเกิด apoptosis อีกที่ ดังนั้น สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย จึงมีผลไปลดการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยยับยั้งการแสดงออกของ Bcl 2 ในระบบที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต อีกทั้งยังมีผลไปลดการแสดงออกของ phospho-mTOR และ total mTOR เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ MPP+ และกลุ่มที่ได้รับ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ซึ่งโดยปกติ mTOR เป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ แต่เมื่ออยู่ในรูปของ phospho-mTOR จะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ดังนั้นการที่เซลล์มีการแสดงออกของ total mTOR น้อยลง แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ได้รับ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย มีการแบ่งตัวได้น้อย แต่เมื่ออยู่ในรูปของ mTOR ที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phospho-mTOR) เซลล์ที่ได้รับ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย มีการยับยั้งการแบ่งตัวได้น้อยลง ซึ่งหมายถึงเซลล์สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น จากรายงานการวิจัยพบว่าการยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถี mTOR ช่วยให้เซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวได้น้อยลง (36, 59) และจากหลักฐานทางงานวิจัยอื่นๆ ยังพบอีกว่าการยับยั้งวิถี mTOR ส่งผลให้ลดการส่งสัญญาณใน mTORC1 เป็นการเพิ่มกระบวนการ autophagy ของเซลล์ให้เพิ่มการย่อยสลายโครงสร้างภายในเซลล์ที่เสื่อมสภาพ เพื่อนำสารต่างๆ กลับมาใช้ใหม่ ทำให้เซลล์มีอัตราการตายน้อยลง (54) และจากการเพิ่มขึ้นของ autophagy ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการย่อยสลายออร์แกเนลล์ที่ผิดปกติซึ่งสะสมอยู่ภายในเซลล์ แทนที่การตายแบบ apoptosis (20) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ต่อการแสดงออกของ Bcl 2, mTOR และ phospho-mTOR เมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ MPP+ และกลุ่ม 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย แสดงให้เห็นว่า 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ที่สามารถยับยั้งการส่งสัญญาณผ่านวิถี mTOR โดยเพิ่มกระบวนการ Autophagy แทนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ประสาทได้ ในขณะที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ไม่มีผลต่อการลดการแสดงออกของ Bcl 2, mTOR และ phospho-mTOR

จากหลักฐานงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า กระจงหางลาย (*Celastrus paniculatus*) ช่วยป้องกันการเกิด cytotoxicity ที่เกิดจาก t-BHP และ LDH โดยช่วยลดความเสียหายของ mitochondrial จากการสูญเสีย mitochondrial membrane potential ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ลดการปล่อย Cytochrom-c และ HSP-70 จึงช่วยลดการเกิด apoptosis และยังช่วยฟื้นฟูสารต้านอนุมูลอิสระ Superoxide dismutase (SOD) และ Catalase (CAT) (12, 35) และยังมีฤทธิ์ทดสอบในหนูทดลองถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดกระจงหางลาย ต่อความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะ oxidative stress ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) พบว่าหนูที่รักษาด้วยสารสกัดจากเมล็ดของกระจงหางลาย มีพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำที่ดีขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา (19) จากผลการทดลองสารสกัดจากเมล็ดกระจงหางลาย ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากพิษของ MPP<sup>+</sup> ในเซลล์ประสาท SH-SY5Y พบว่ามีผลช่วยป้องกันการตายของเซลล์ได้ ซึ่งมีหลักฐานทางงานวิจัยที่แสดงถึงการให้เซลล์ประสาท SH-SY5Y เป็นแบบจำลองในการศึกษาการตายของเซลล์ประสาทโดปามีน ที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคพาร์กินสัน เนื่อง จาก SH-SY5Y cell line มีคุณสมบัติคล้ายคลึงเซลล์ประสาท และสามารถเปลี่ยนสภาพไปเป็น dopaminergic neurons และ Serotonergic neurons ได้เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย Retinoic acid (50,52) และมีการศึกษาพบว่า MPTP เป็น neurotoxins ที่เชื่อมโยงกับรูปแบบของโรคพาร์กินสันในสัตว์ทดลองและมนุษย์อย่างชัดเจน และเป็นรูปแบบที่ใช้ศึกษากันมากที่สุด (34) ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ สารสกัดจากเมล็ดกระจงหางลาย มีผลช่วยป้องกันการตายของเซลล์ประสาทโดปามีน จากพิษของ MPP<sup>+</sup> ที่อาจก่อให้เกิดโรคพาร์กินสันได้ นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากเมล็ดกระจงหางลาย สามารถยับยั้งการทำงานของวิถี mTOR ได้ ซึ่งมีการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ mTOR pathway ต่อการส่งสัญญาณในระบบประสาท เนื่องจากการส่งสัญญาณ mTORC1 ได้รับการยอมรับว่าเป็นตัวควบคุมที่สำคัญที่สุดของ autophagy ที่เกี่ยวข้องกับโรค neurodegenerative โดยการยับยั้งการทำงานของ mTORC1 จะไปเพิ่ม กระบวนการ autophagy ในระบบประสาท ซึ่งมีความสำคัญมากเนื่องจากเซลล์ประสาทไม่มีการแบ่งเซลล์มาทดแทนเซลล์เดิมที่อายุมากขึ้น จึงมีโครงสร้างของเซลล์ที่เสียหายมากขึ้นประกอบกับประสิทธิภาพของ autophagy ที่ลดลงตามอายุ ทำให้เกิดการสะสมโปรตีนที่ผิดปกติมากขึ้นเรื่อยๆ และเกิดการตายของเซลล์ประสาท (52) ซึ่งมีข้อมูลสนับสนุนว่าการทำงานของ autophagy มีการลดลงในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางระบบประสาทในกลุ่ม neurodegenerative disease เช่น โรค Alzheimer และโรค Parkinson ที่มีการตายของเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่พบในคนสูงอายุ (32-33, 51) ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดกระจงหางลาย สามารถช่วยลดความเสี่ยงที่อาจก่อให้เกิดโรคพาร์กินสัน จากการยับยั้งการส่งสัญญาณในวิถี mTOR ได้



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาผลของการให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายเป็นเวลา 14 วัน ในหนูทดลอง และในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่า สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายมีฤทธิ์บำรุงความจำกล่าวคือ หนูทดลองใช้เวลาในการหา platform ที่ซ่อนอยู่ใต้น้ำลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังพบว่าหนูที่ได้รับ สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายเป็นเวลา 14 วัน เพิ่มการแสดงออกของ mTOR ในสมองส่วน hippocampus แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายมีฤทธิ์เพิ่มการมีชีวิตของเซลล์ประสาทและยับยั้งการเกิด apoptosis นอกจากนี้ งานวิจัยชิ้นนี้ยังทำการศึกษาฤทธิ์ของกระถางลายในเซลล์เพาะเลี้ยง ชนิด SH-SY5Y พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และยังเพิ่มค่าการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงได้อีกด้วย ดังนั้นจากผลการทดลองครั้งนี้บ่งชี้ว่า สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย สามารถช่วยลดความเสี่ยงที่อาจก่อให้เกิดโรคพาร์กินสัน จากการยับยั้ง การส่งสัญญาณในวิถี mTOR ได้

### บรรณานุกรม

1. กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข. (2546). แนวปฏิบัติบริการสุขภาพด้านการดูแลผู้สูงอายุ: การดูแลรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะสมองเสื่อม.
2. คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่องบัญชียาจากสมุนไพร แนบท้ายประกาศบัญญัติยาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2559. ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนพิเศษ 86 ง, ลงวันที่ 12 เมษายน, หน้า 11 2559.
3. สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. พรรณไม้พื้นบ้านอีสาน เล่ม 1. มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. หน้า 83. 2544.
4. สถาบันเวชศาสตร์ผู้สูงอายุ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2555.
5. สุทธิชัย จิตะพันธ์กุล. (2546). คลินิกเวชปฏิบัติปริทัศน์: ปัญหาการดูแลผู้ป่วยสูงอายุที่มีสมองเสื่อม. วารสารคลินิก. 19 (6).
6. Arendt T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118(1): 167-179.
7. Aroma N, Pandey-Rai S. (2014). GC-MS analysis of the essential oil of *Celastrus paniculatus* Willd: Seeds and antioxidant, anti-inflammatory study of its various solvent extracts. *Industrial Crops and Products* 61, 345-351.
8. Bhagya V, Christofer T, Shankaranarayana Rao BS. (2016). Neuroprotective effect of *Celastrus paniculatus* on chronic stress-induced cognitive impairment. *Indian J Pharmacol.* 48(6): 687-693.
9. Bhanumathy M, Harish MS, Shivaprasad HN, Sushma G. (2010) Nootropic activity of *Celastrus paniculatus* seed. *Pharmaceutical Biology* 48 (3): 324–327.
10. Burke SN and Barnes CA. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci.* 7, 30-40.
11. Chamniansawat S, Chongthammakun S. (2010). Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cell. *Neurosci Lett.* 470: 49–54.
12. Chen K, Lu Y, Liu C, Zhang L, Fang Z, Yu G. (2018) Morroniside prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induced apoptosis via attenuating JNK and p38 MAPK phosphorylation. *Eur J Pharmacol.* 5; 834: 295-304.
13. Geng YQ, Guan JT, Xu XH, Fu YC. (2010) Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *BiochemBiophys Res Commun.* 11;396(4): 866-869.
14. Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Grösgen S, Hauptenthal VJ, Blümel T, Hundsdörfer B, Zimmer VC, Mylonas NT, Tanila H, Müller U, Grimm HS, Hartmann T. (2015) APP intracellular domain derived from amyloidogenic  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci.* 7: 77.
15. Hasselmo ME. (2006) The Role of Acetylcholine in Learning and Memory. *Curr Opin Neurobiol.* 16 (6): 710–715.

16. Hiester BG, Becker MI, Bowen AB, Schwartz SL, Kennedy MJ (2018). Mechanisms and Role of Dendritic Membrane Trafficking for Long-Term Potentiation. *Front Cell Neurosci.* 30;12: 391.
17. Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GC, Kasai H. (2008) The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57, 719–729.
18. Kandel ER, Schwartz JH. (1982) Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science.* 218: 433–443.
19. Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 33: 121–129.
20. Kim MJ, Oh SJ, Park SH, Kang HJ, Won MH, Kang TC, Park JB, Kim JI, Kim J, Lee JY. (2007) Neuronal loss in primary long-term cortical culture involves neurodegeneration-like cell death via calpain and p35 processing, but not developmental apoptosis or aging. *Exp Mol Med.* 39(1): 14-26.
21. Korobova F, Svitkina T. (2010) Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *MolBiol Cell.* 21: 165-176.
22. Kulkarni YA, Agarwa S, and Garud MS. (2015) Effect of Jyotishmati (*Celastrus paniculatus*) seeds in animal models of pain and inflammation. *J Ayurveda Integr Med.* 6(2): 82–88.
23. Kumar KH, Venuprasad MP, Jayashree GV, Rachitha P, Krupashree K, Pal A, Khanum F. (2015) *Celastrus paniculatus* Willd. mitigates t-BHP induced oxidative and apoptotic damage in C2C12 murine muscle cells. *Cytotechnology* 67: 955–967.
24. Lamprecht R, LeDoux J. (2004) Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci.* 5(1): 45–54.
25. Nalini K, Karanth KS, Rao A, Aroor AR. (1995) Effects of *Celastrus paniculatus* on passive avoidance performance and biogenic amine turnover in albino rats. *J Ethnopharmacol.* 47(2): 101-108.
26. Nicholson DA, Yoshida R, Berry RW, Gallagher M, and Geinisman Y. (2004) Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments. *J Neurosci.* 24: 7648-7653.
27. Nunomura A, Moreira PI, Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Smith MA, Perry G. (2011) Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders. *Med Sci Monit.* 17(4): BR91-96.
28. Penzes P, Cahill M E, Jones KA, Vanleeuwen JE, Woolfrey KM (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 14: 285–293.
29. Rapp PR, Deroche PS, Mao Y, and Burwell RD. (2002) Neuron number in the parahippocampal region is preserved in aged rats with spatial learning deficits. *Cereb Cortex.* 12: 1171-1199.

30. Rasmussen T, Schliemann T, Sorensen JC, Zimmer J and West MJ. (1996) Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol. Aging* 17: 143–147.
31. Rust MB, Gurniak CB, Renner M, Vara H, Morando L, Gorlich A, et al. (2010) Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO J.* 29: 1889–1902.
32. Salazar SV, Cox TO, Lee S, Brody AH, Chyung AS, Haas LT, Strittmatter SM. (2019) Alzheimer's Disease Risk Factor Pyk2 Mediates Amyloid- $\beta$ -Induced Synaptic Dysfunction and Loss. *J Neurosci.* 39(4): 758-772.
33. Seshadri M, Mazi-Kotwal N, Aguis M. (2013) Reversible mild cognitive impairment--a case report. *Psychiatr Danub.* 25 Suppl 2: S358-361.
34. Steward O, Worley P. (2002) Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiol Learn Mem.* 78(3): 508–527.
35. Susikumar P, Sharathna P. (2018) Dihydro- $\beta$ - agarofuran sesquiterpenoids from the seeds of *Celastrus paniculatus* Willd. and their  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Phytochemistry Letters.* 26: 1-8.
36. Wang L, Zhang Z, Hou L, Wang Y, Zuo J, Xue M, Li X, Liu Y, Song J, Pan F, Pu T (2019). Phytic acid attenuates upregulation of GSK-3 $\beta$  and disturbance of synaptic vesicle recycling in MPTP-induced Parkinson's disease models. *Neurochem Int.* 129: 104507.
37. Alvarez VA, Sabatini BL. (2007) Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* 30, 79–97.
38. Chakraborty TR, Gore AC. (2004) Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. *Exp Biol Med.* 229: 977-987.
39. Chamniansawat S, Chongthammakun S. (2012) A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. *Exp Mol Med.* 44: 403-411.
40. Chamniansawat S, Chongthammakun S. (2015) Inhibition of hippocampal estrogen synthesis by reactive microglia leads to down-regulation of synaptic protein expression. *Neurotoxicol.* 46: 25-34.
41. Chamniansawat S, Sawatdiyaphanon C. (2018) Age-Related Memory Impairment Associated With Decreased Endogenous Estradiol in the Hippocampus of Female Rats. *Int J Toxicol.* 37(3): 207-215.
42. Chih B, Afridi SK, Clark L, Scheiffele P. (2004) Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Hum Mol Genet.* 13(14): 1471-1477.
43. Chih B, Engelman H, Scheiffele P. (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science.* 307(5713): 1324-1328.
44. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 51(1): 7-61.

45. Dong W, Cheng S, Huang F, Fan W, Chen Y, Shi H, He H. (2012) Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging. *Neurotox Res.* 22(3): 231-248.
46. Freudenberg F, Resnik E, Kollek A, Celikel T, Sprengel R, Seeburg PH. (2016) Hippocampal GluA1 expression in *Gria1*<sup>-/-</sup> mice only partially restores spatial memory performance deficits. *Neurobiol Learn Mem.* 2016 Nov;135: 83-90.
47. Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA. (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci.* 20: 3993–4001.
48. Hirano T (2018). Visualization of Exo- and Endocytosis of AMPA Receptors During Hippocampal Synaptic Plasticity Around Postsynaptic-Like Membrane Formed on Glass Surface. *Front Cell Neurosci.* 12: 442.
49. Lau CG, Takayasu Y, Rodenas-Ruano A, Paternain AV, Lerma J, Bennett MV, Zukin RS. (2010) SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA receptor trafficking. *J Neurosci.* 30(1): 242-254.
50. Pollard TD, Cooper JA. (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326: 1208–1212.
51. Sengupta P. (2013) The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Med* 4: 624-630.
52. Smith CC, McMahon LL. (2005) Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J Neurosci.* 25(34): 7780-7791.