



ฤทธิ์ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในการป้องกันความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCD) ในหนูไม่สับสน ICR ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาทด้วย D-galactose

สุจิตา โอภาณี

คุณฐิณีพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาการวิจัยและสถิติทางวิทยาการปัญญา

วิทยาลัยวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา มหาวิทยาลัยบูรพา

2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

ฤทธิ์ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในการป้องกันความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI) ในหนูไมส์ชนิด ICR ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาทด้วย D-galactose



สุจิตา โอภาณี

คุณูปการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาการวิจัยและสถิติทางวิทยาการปัญญา

วิทยาลัยวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา มหาวิทยาลัยบูรพา

2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

Effects of Thai Medicinal Plants in Longevity Remedy for Prevent Mild Cognitive Impairment
(MCI) in ICR Mice Induced by D-galactose



SUTHITA OBHASI

A DISSERTATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR DOCTOR DEGREE OF PHILOSOPHY
IN RESEARCH AND STATISTICS IN COGNITIVE SCIENCE
COLLEGE OF RESEARCH METHODOLOGY AND COGNITIVE SCIENCE
BURAPHA UNIVERSITY

2024

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมคุณิพนธ์และคณะกรรมการสอบคุณิพนธ์ได้พิจารณาคุณิพนธ์
นิพนธ์ของ สุจิตา โอภาณี ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปรัชญาคุณิพนธ์บัณฑิต สาขาวิชาการวิจัยและสถิติทางวิทยาการปัญญา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมคุณิพนธ์

คณะกรรมการสอบคุณิพนธ์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรัชญา แก้วแก่น)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ โพธิ์ศรี)

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัครเดช ศิริพร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรัชญา แก้วแก่น)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ โพธิ์ศรี)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริญญา เรืองทิพย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุทธนา จันทะจิน)

..... คณบดีคณะศึกษาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. สฎายุ ชีระวนิชตระกูล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา อนุมัติให้รับคุณิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาคุณิพนธ์บัณฑิต สาขาวิชาการวิจัยและสถิติทางวิทยาการปัญญา ของ
มหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทวัส แจ่มเยี่ยม)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

61810017: สาขาวิชา: การวิจัยและสถิติทางวิทยาการปัญญา; ปร.ด. (การวิจัยและสถิติทาง
วิทยาการปัญญา)

คำสำคัญ: ตำรับยาอายุวัฒนะ, โครงข่ายทางเภสัชวิทยา, มอริสวอเตอร์เมท

ศุจิตา โอภาณี : ฤทธิ์ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในการป้องกันความผิดปกติเล็กน้อย
ของความสามารถสมอง (MCI) ในหนูไมส์ชนิด ICR ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาท
ด้วย D-galactose. (Effects of Thai Medicinal Plants in Longevity Remedy for Prevent Mild Cognitive
Impairment (MCI) in ICR Mice Induced by D-galactose) คณะกรรมการควบคุมคุณภาพพืช: ปรัชญา
แก้วแก่น, ปร.ด., สันติ โพธิ์ศรี, ปร.ด. ปี พ.ศ. 2567.

ความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI) เป็นความเสื่อมถอยเล็กน้อยใน
กระบวนการรู้คิดซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการแก่และมีโอกาสที่จะพัฒนาไปสู่ภาวะสมองเสื่อม ตำรับยา
อายุวัฒนะ (AAR) ในทางการแพทย์แผนไทยมีการใช้เพื่อส่งเสริมให้มีอายุยืนยาว มีการพิสูจน์กลไก 3
ระยะ ระยะที่ 1: ทำนายวิธีการออกฤทธิ์ของสารประกอบตำรับยาอายุวัฒนะกับ MCI ด้วยการทำ Network
pharmacology จากการศึกษาพบว่ามี 178 bioactive compounds และ 105 โปรตีนเป้าหมาย ที่ผ่านการคัด
กรอง โดยโปรตีนเป้าหมาย 10 อันดับแรกในโครงข่าย ได้แก่ GRB2, SRC, TP53, MAPK1, ESR1,
PRKCA, STAT3, PIK3R1, FYN และ AKT1 และพบ 37 วิธีที่สำคัญในกลไก ระยะที่ 2: ศึกษา
ความสามารถของ AAR ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TPC, DPPH assay, ABTS assay, FRAP assay ผล
พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันในปริมาณที่ต่ำ และศึกษาผลของสารสกัด AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ
ในการปกป้องเซลล์ประสาท SH-SY5Y จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมด้วย D-galactose ไม่พบร้อยละ
การรอดชีวิตของเซลล์ ที่มากกว่า 80% ระยะที่ 3: ศึกษาสาร AAR ต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำใน
หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม หนูทดลองที่ได้รับสารสกัด AAR ขนาด 500 mg/ kg BW และ
เหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม ศึกษาการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze test (MWM) ทำการวัด
ระยะเวลาในการค้นหาแท่นใต้น้ำ (EL) และระยะเวลาที่หนูว่ายวนในโซนที่เคยมีแท่นใต้น้ำ (TTSP) ผล
พบว่า AAR ส่งผลต่อการเรียนรู้และความจำ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนั้นกลุ่มที่ได้รับ AAR มี
พฤติกรรมการเรียนรู้ที่ดีขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 แต่ความจำเรียกคืนผลยังไม่แน่ชัดเมื่อเทียบกับกลุ่ม
ควบคุมอื่นๆ และเมื่อตรวจสอบ MDA ในสมองพบว่ากลุ่ม มีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ส่วน SOD ไม่
พบความแตกต่าง

61810017: MAJOR: RESEARCH AND STATISTICS IN COGNITIVE SCIENCE;
Ph.D. (RESEARCH AND STATISTICS IN COGNITIVE SCIENCE)

KEYWORDS: Longevity remedy, Network pharmacology, Morris Water Maze

SUTHITA OBHASI : EFFECTS OF THAI MEDICINAL PLANTS IN
LONGEVITY REMEDY FOR PREVENT MILD COGNITIVE IMPAIRMENT (MCI) IN ICR
MICE INDUCED BY D-GALACTOSE. ADVISORY COMMITTEE: PRATCHAYA
KEAWKAEN, Ph.D. SANTI PHOSRI, Ph.D. 2024.

Mild cognitive impairment (MCI) manifests as a mild decline in cognitive functions associated with aging, with the potential to progress to dementia. The Anti-Aging Remedy (AAR) from Thai traditional medicine aims to promote longevity, proving mechanisms in three phases. Phase 1: Prediction of significant pathways in the biological systems of AAR and MCI using Network Pharmacology. The study identified 178 bioactive compounds and 105 target proteins that passed screening. The top 10 target proteins in the network were GRB2, SRC, TP53, MAPK1, ESR1, PRKCA, STAT3, PIK3R1, FYN, and AKT1, and 37 significant pathways were found in the mechanism. Phase 2: Evaluation of AAR's antioxidant potential using TPC, DPPH assay, ABTS assay, and FRAP assay. The results indicated antioxidant effects at low doses and investigated the protective effects of AAR extracts on SH-SY5Y neurons induced by D-galactose-induced degeneration. While cell survival percentages did not exceed 80%. Phase 3: Assessment of AAR extract (500 mg/kg BW) on induced degeneration in ICR mice. Learning and memory were evaluated using the MWM, measuring the time to escape latency (EL) and the total time to spend platform (TTSP). Results showed that AAR affected learning and memory compared to control groups. Moreover, AAR exhibited improved learning behavior in weeks 3 and 4, although memory recall effects were unclear. In addition, there was a decrease in MDA levels in the brain when compared to the control group, but no discernible change in SOD levels.

กิตติกรรมประกาศ

ขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาหลักและที่ปรึกษาร่วม คณาจารย์ทุกท่าน ที่และคอยผลักดัน สนับสนุนให้การศึกษาสำเร็จลุล่วง

ขอบพระคุณคุณพ่อพยนต์ คุณแม่นารีรัตน์ พี่ชายวิศ ที่คอยส่งเสริม สนับสนุน ให้กำลังใจ ในด้านการเรียนเสมอมา

ขอบพระคุณ ดร.ดำรงศักดิ์ จินารัตน์ ที่ให้คำปรึกษาและสนับสนุนแรงกายในการทำแลปอยู่ เสมอ

ขอบคุณมิตรสหายและเพื่อนร่วมทาง ที่คอยให้กำลังใจและถามไถ่กันเสมอ และขอบคุณตัวเองที่ยังคงอดทนพยายาม จนงานสำเร็จลุล่วง

ขอบคุณสถานที่ วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี ห้องปฏิบัติการ กลาง คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ห้องปฏิบัติการสัตว์ทดลองวิทยาการปัญญาาระบบ ประสาท วิทยาลัยวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และห้องปฏิบัติการ ในการศึกษาทดลอง

งานวิจัยนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2566 จากบัณฑิต วิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา

สุจิตา โอภาณี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ถ
บทที่ 1 บทนำ	22
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	22
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	24
สมมติฐานของการวิจัย	24
กรอบแนวคิดในการวิจัย	25
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	25
ขอบเขตของการวิจัย	26
นิยามศัพท์เฉพาะ	27
บทที่ 2 แนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	29
ความคิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง	30
อาการและอาการแสดง	30
การดำเนินโรคและความรุนแรง	31
การตรวจประเมิน	31
กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิด MCI	32
การอักเสบ	32

ความเครียดออกซิเดชัน	33
กลไกอื่นที่เกี่ยวข้อง	34
อะซีติล โคลินเอสเตอเรส	34
เบต้า-อะไมลอยด์	35
แนวทางการรักษา MCI	35
การรักษาด้วยการใช้ยา	36
การรักษาด้วยวิธีการอื่นๆ	36
ตำรับยาอายุวัฒนะ	37
สมุนไพรในตำรับยาอายุวัฒนะ	45
ทิงถ่อน (Ting-thon)	45
ลักษณะของเครื่องยา	45
องค์ประกอบทางเคมี	45
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของทิงถ่อนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด MCI	45
ตะโกนา (Tako-na)	46
ลักษณะของเครื่องยา	46
องค์ประกอบทางเคมี	47
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตะโกนาที่เกี่ยวข้องกับการเกิด MCI	47
บอระเพ็ด (Bora-phet)	47
ลักษณะของเครื่องยา	47
องค์ประกอบทางเคมี	48
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบอระเพ็ดที่เกี่ยวข้องกับ MCI	48
หญ้าแห้วหมู (Ya-haeo-mu)	49
ลักษณะของเครื่องยา	49
องค์ประกอบทางเคมี	49

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเห็บหมูที่เกี่ยวข้องกับ MCI	50
ข่อย (Khoi)	50
ลักษณะของเครื่องยา	51
องค์ประกอบทางเคมี	51
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของข่อยที่เกี่ยวข้องกับการเกิด MCI	51
พริกไทย (Phrik-thai)	52
ลักษณะของเครื่องยา	52
องค์ประกอบทางเคมี	53
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพริกไทยที่เกี่ยวข้องกับ MCI	53
การบ่งชี้เครื่องยาด้วยวิธีการโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง	56
ชนิดของน้ำยาพ่น	56
การค้นหและการพัฒนายา	61
การออกแบบยา	61
โครงข่ายทางเภสัชวิทยา	62
โปรแกรมสำเร็จรูป	63
ฐานข้อมูลสาธารณะ	64
การศึกษาระดับพรีคลินิก	65
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	66
การศึกษาตำรับยากับการสร้างโครงข่ายทางเภสัชวิทยา	66
การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย D-galactose	72
การศึกษาในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม	73
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	75
แผนผังขั้นตอนการดำเนินการวิจัยในแต่ละระยะ	75
ระยะที่ 1 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยาอายุวัฒนะผ่านโครงข่ายทางเภสัชวิทยา	76

เครื่องมือในการศึกษา.....	76
วิธีการศึกษา.....	77
ระยะที่ 2 การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ และทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์ ประสาทเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม	81
การทดลองที่ 2.1 การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ.....	81
เครื่องมือในการศึกษา.....	81
วิธีการศึกษา.....	83
การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ	83
เตรียมเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะ	83
เตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ	84
การตรวจสอบสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ.....	85
คำนวณหาปริมาณของสารสกัด (Extraction yield; EY).....	85
ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography; TLC).....	86
การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพร	86
วิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content; TPC)	86
วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Scavenging activity).....	87
การทดลองที่ 2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำให้ เกิดการเสื่อม	89
เครื่องมือในการศึกษา.....	89
วิธีการศึกษา.....	90
เตรียมสารสำหรับทดสอบ	90
เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง.....	90
ทดสอบความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity)	91

ทดสอบผลของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะต่อเซลล์ประสาทที่เตรียมสำหรับทดสอบ	92
การประเมินคุณภาพและการรอดชีวิตของเซลล์	92
ประเมินการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (Cell morphology)	92
นับจำนวนเซลล์ ด้วยวิธี Trypan blue exclusion method	92
ตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ด้วยวิธี MTT cell proliferation assay	92
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	93
ระยะที่ 3 การศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI	94
การทดลองที่ 3.1 การศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลอง	94
เครื่องมือในการศึกษา	94
วิธีการศึกษา	96
การเตรียมสัตว์ทดลอง	96
การฝึกหนูทดลอง	96
การแบ่งกลุ่มหนูทดลอง	97
การป้อนสารทดสอบ	98
การทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze (MWM)	98
การกำจัดหนูทดลองเมื่อสิ้นสุดการศึกษาพฤติกรรม	99
การวิเคราะห์ข้อมูล	99
การทดลองที่ 3.2 การตรวจสอบการตายของเซลล์ประสาทและตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิด MCI ในหนูทดลอง	100
เครื่องมือในการทดลอง	100
วิธีการศึกษา	101
การเก็บสมองหนูทดลอง	101

การนับจำนวนเซลล์ประสาท.....	102
การวิเคราะห์ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) ในเซลล์สมองหนู.....	103
การวิเคราะห์ Lipid peroxidation.....	103
การวิเคราะห์ Superoxide dismutase (SOD) activity.....	103
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	103
การกำหนดจุดทดลองเมื่อสิ้นสุดการศึกษา.....	104
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	105
ระยะที่ 1 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยาอายุวัฒนะผ่านโครงข่ายทางเภสัชวิทยา (Network pharmacology; NP).....	105
โครงสร้างสารประกอบของเครื่องยา.....	105
โครงสร้างที่เหมาะสมในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	106
โปรตีนเป้าหมายของสารประกอบเครื่องยา.....	107
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรค.....	108
โครงข่ายทางเภสัชวิทยาและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	109
วิธีที่มีนัยสำคัญจากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์.....	118
โมดูลที่สำคัญในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์.....	121
ระยะที่ 2 การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ และทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม.....	124
การทดลองที่ 2.1 การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ.....	124
การเตรียมเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะ.....	124
การตรวจสอบสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ.....	127
การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ.....	131
การวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content; TPC).....	131
วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (scavenging activity).....	133

การทดลองที่ 2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำให้ เกิดการเสื่อม	138
ทดสอบความเข้มข้นของ AAR ที่เป็นพิษต่อเซลล์.....	138
ทดสอบความเข้มข้นของ D-galactose ที่เป็นพิษต่อเซลล์.....	140
ผลของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะต่อการปกป้องเซลล์ประสาท	142
ระยะที่ 3 การศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI.....	146
การทดลองที่ 3.1 การศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลอง	146
ผลการฝึกหนูทดลอง	146
ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วย MWM ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม.....	148
ผลของระยะเวลาในการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม	149
ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำในของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม.....	153
ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงระยะเวลา.....	156
การทดลองที่ 3.2 การตรวจสอบการตายของเซลล์ประสาทและตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิด MCI ในหนูทดลอง.....	158
น้ำหมักสมองหนูทดลอง	158
จำนวนเซลล์ประสาทที่ย้อมติดสี H&E.....	158
ผลการวิเคราะห์ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) ในสมองหนูทดลอง.....	164
ผลการย้อมติดสีของเซลล์และสารบ่งชี้ทางชีวภาพในสมองหนูทดลอง	167
บทที่ 5 สรุปอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	169
ระยะที่ 1 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยาอายุวัฒนะผ่าน โครงข่ายทางเภสัชวิทยา (Network pharmacology; NP).....	169
ผลของการสร้างเครือข่ายทางเภสัชวิทยา.....	169
ผลของวิธีที่มีนัยสำคัญ.....	174
ผลของโมดูลที่สำคัญในเครือข่าย	178

สรุปการอภิปรายผลระยะที่ 1.....	179
ระยะที่ 2 การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ และทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์ ประสาทเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม	181
การตรวจสอบสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ	181
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	181
ผลของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในการปกป้องเซลล์ประสาท	182
สรุปการอภิปรายผลระยะที่ 2.....	182
การออกฤทธิ์ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะมีผลในกระบวนการต้านออกซิเดชันผ่านการ เหนี่ยวนำด้วย D-galactose ในปริมาณที่ต่ำ เห็นได้จากผลของการต้านออกซิเดชันใน หลอดทดลองและผลการปกป้องการเกิดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย D-galactose ในเซลล์ SH-SY5Y แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกอื่นที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม เช่น ยับยั้งการอักเสบ หรือมีฤทธิ์ต่อโรคในกลุ่ม cancer	182
ระยะที่ 3 การศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI	184
การทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ	184
การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ประสาทที่ถูกย้อมด้วย H&E	184
การวิเคราะห์ปริมาณ Biomarkers ในสมองหนูทดลอง.....	185
สรุปผลการอภิปรายระยะที่ 3.....	186
ข้อเสนอแนะในการศึกษา.....	187
ภาคผนวก	188
บรรณานุกรม	191
ประวัติย่อของผู้วิจัย	204

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตำรับยาอายุวัฒนะ	39
ตารางที่ 2	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะที่เกี่ยวข้องกับการเกิด MCI.....	54
ตารางที่ 3	ตัวอย่างการตรวจสอบเครื่องยาและตำรับยาด้วยวิธี TLC ในตำรับยา	57
ตารางที่ 4	ขั้นตอนและเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาทาง Network Pharmacology	69
ตารางที่ 5	แหล่งที่มาของเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะ	83
ตารางที่ 6	จำนวนโครงสร้างสารประกอบจากเครื่องยาแต่ละชนิดที่ได้จากฐานข้อมูล	105
ตารางที่ 7	จำนวนสารประกอบที่ผ่านการพิจารณาคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์	106
ตารางที่ 8	จำนวนสารประกอบเครื่องยาที่คงเหลือ	107
ตารางที่ 9	จำนวนโปรตีนเป้าหมายของสารประกอบในเครื่องยาอายุวัฒนะ	108
ตารางที่ 10	จำนวนโปรตีนเป้าหมายของสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับโรค	109
ตารางที่ 11	โปรตีนเป้าหมายที่เชื่อมต่อกับโครงสร้างสารประกอบในตำรับยาอายุวัฒนะ.....	111
ตารางที่ 12	วิธีที่มีนัยสำคัญของตำรับยาอายุวัฒนะ	118
ตารางที่ 13	รายละเอียดการแบ่งกลุ่มของวิธีที่มีนัยสำคัญในตำรับยาอายุวัฒนะ	120
ตารางที่ 14	โมดูลที่สำคัญของตำรับยาอายุวัฒนะ	121
ตารางที่ 15	ผลการตรวจสอบลักษณะของเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะ	125
ตารางที่ 16	ผลการตรวจสอบปริมาณสิ่งแปลกปลอมในเครื่องยาตำรับยาอายุวัฒนะ	127
ตารางที่ 17	ค่า hR_f ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในวัฏภาคเคลื่อนที่ Ethyl acetate: Hexane อัตราส่วน 40:60	130
ตารางที่ 18	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี TPC ..	132
ตารางที่ 19	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี DPPH assay	133

ตารางที่ 20 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี ABTS assay	134
ตารางที่ 21 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี FRAP assay	135
ตารางที่ 22 เปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะด้วยวิธีต่างๆ เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน	136
ตารางที่ 23 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	138
ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสาร AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม	139
ตารางที่ 25 การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของร้อยละการรอดชีวิตของกลุ่มที่ได้รับสาร AAR ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม	139
ตารางที่ 26 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร D-galactose ที่ความเข้มข้นต่างๆ	140
ตารางที่ 27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับ D-galactose ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม.....	141
ตารางที่ 28 การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของร้อยละการรอดชีวิตของกลุ่มที่ได้รับ AAR ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม	141
ตารางที่ 29 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร AAR ความเข้มข้นต่างๆ และสาร D-galactose ความเข้มข้น 50 mM.....	142
ตารางที่ 30 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร AAR ความเข้มข้นต่างๆ และสาร D-galactose ความเข้มข้น 100 mM.....	143
ตารางที่ 31 การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของร้อยละการรอดชีวิตของกลุ่มที่ได้รับ AAR ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม	144
ตารางที่ 32 การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของร้อยละการรอดชีวิตของกลุ่มที่ได้รับ AAR ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มที่ได้รับสาร D-galactose ความเข้มข้น 100 mM.....	145
ตารางที่ 33 ระยะเวลาเฉลี่ยที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจือ (EL) ในวันที่ทำการฝึก	146

ตารางที่ 34	ระยะเวลาเฉลี่ยที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจือ (EL) ในแต่ละกลุ่ม	147
ตารางที่ 35	ระยะเวลาเฉลี่ยของหนูทดลองแต่ละกลุ่มในการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วย MWM.....	148
ตารางที่ 36	ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการทดสอบระหว่างกลุ่ม	149
ตารางที่ 37	การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม None กับ Water	150
ตารางที่ 38	การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม None กับ AAR.....	150
ตารางที่ 39	การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม None กับ Donepezil.....	151
ตารางที่ 40	การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม Water กับ AAR.....	152
ตารางที่ 41	การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม Water กับ Donepezil.....	152
ตารางที่ 42	การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม AAR กับ Donepezil.....	153
ตารางที่ 43	ผลการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงระยะเวลา	154
ตารางที่ 44	การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม None.....	154
ตารางที่ 45	การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม Water.....	155
ตารางที่ 46	การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม None.....	155
ตารางที่ 47	การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม Donepezil	156
ตารางที่ 48	น้ำหนักเฉลี่ยของสมองหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม	158
ตารางที่ 49	ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในสมองแต่ละกลุ่ม	162
ตารางที่ 50	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในแต่ละกลุ่ม	163
ตารางที่ 51	การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของร้อยละจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในสมองส่วน Cerebral cortex แต่ละกลุ่ม	163
ตารางที่ 52	ปริมาณของ Malondialdehyde (MDA) ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม	164
ตารางที่ 53	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ MDA ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม	165
ตารางที่ 54	การเปรียบเทียบปริมาณของ MDA ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม	165

ตารางที่ 55 ปริมาณการทำงานของ SOD ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม.....166

ตารางที่ 56 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า SOD activity (%) ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม
167



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 การศึกษาผลของตำรับยาอายุวัฒนะในการป้องกันการเกิดความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI) จากการเหนี่ยวนำด้วยสาร D-galactose.....	25
ภาพที่ 2 เปลือกต้นทิ้งถ่อน	45
ภาพที่ 3 เปลือกต้นตะโกนา	46
ภาพที่ 4 เถาบอระเพ็ด	47
ภาพที่ 5 หญ้าแห้วหมู	49
ภาพที่ 6 เมล็ดข่อย.....	50
ภาพที่ 7 เมล็ดพริกไทยดำ	52
ภาพที่ 8 เครื่องหมายการค้าของโปรแกรมสำเร็จรูปที่ใช้ในงานค้นคว้าและพัฒนาฯ	63
ภาพที่ 9 ตัวอย่างฐานข้อมูลสารณะที่ใช้ในงานออกแบบและพัฒนาฯ.....	64
ภาพที่ 10 ขั้นตอนการศึกษาในแต่ละระยะ	75
ภาพที่ 11 ตัวอย่างการลงข้อมูลสารประกอบเครื่องยาในโปรแกรม Excel	77
ภาพที่ 12 ตัวอย่างการลงข้อมูลโปรตีนเป้าหมายของสารประกอบเครื่องยาในโปรแกรม Excel.....	78
ภาพที่ 13 ตัวอย่างการลงข้อมูลอื่นที่เกี่ยวข้องกับโรคของสารประกอบในโปรแกรม Excel.....	79
ภาพที่ 14 การเชื่อมต่อโครงข่ายด้วยโปรแกรม Cytoscape	79
ภาพที่ 15 ตัวอย่างการตรวจหาปริมาณสิ่งแปลกปลอมในเมล็ดข่อย	84
ภาพที่ 16 เครื่องยาที่ผ่านการอบ และนำไปบด	85
ภาพที่ 17 เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator)	85
ภาพที่ 18 เซลล์ SH-SY5Y cell line; Human neuroblastoma.....	91
ภาพที่ 19 เครื่องมือ Morris water maze (MWM)	95
ภาพที่ 20 การพักสัตว์ทดลอง	96

ภาพที่ 21 การฝึกหนูทดลอง วันที่ 1 และวันที่ 3-7.....	97
ภาพที่ 22 แผนการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze (MWM).....	98
ภาพที่ 23 การเก็บสมองหนูทดลอง	101
ภาพที่ 24 สไลด์เซลล์สมองหนูทดลองที่ย้อมด้วย H&E.....	102
ภาพที่ 25 โครงข่ายของตำรับยาอายุวัฒนะ (Network pharmacology).....	110
ภาพที่ 26 โครงสร้างสารประกอบที่มีคีรีสูงสุด 10 อันดับ.....	117
ภาพที่ 27 การศึกษาของ Network pharmacology ของตำรับยาอายุวัฒนะ	123
ภาพที่ 28 สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ.....	128
ภาพที่ 29 ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วย TLC ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ	129
ภาพที่ 30 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ด้วยวิธี TPC	132
ภาพที่ 31 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ด้วยวิธี DPPH assay	133
ภาพที่ 32 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ด้วยวิธี ABTS assay	134
ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ด้วยวิธี FRAP assay.....	136
ภาพที่ 34 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะด้วยวิธีต่างๆ เมื่อเทียบกับสารละลาย มาตรฐาน	137
ภาพที่ 35 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่ความ เข้มข้นต่างๆ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม	138
ภาพที่ 36 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร D-galactose ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม	140
ภาพที่ 37 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสาร D-galactose ความเข้มข้น 50 mM เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม.....	142
ภาพที่ 38 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสาร D-galactose ความเข้มข้น 100 mM เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม.....	144
ภาพที่ 39 ระยะเวลาเฉลี่ยที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจือ (EL) ในช่วงการฝึก	147
ภาพที่ 40 ภาพตัดขวาง (Transverse section) ของสมองหนู Rat (Rao, Little, & Sills, 2014).....	158

ภาพที่ 41 สมองบริเวณ Cerebral cortex, Cerebellum และ Hippocampus ในหนูทดลองแต่ละกลุ่ม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 4x.....159

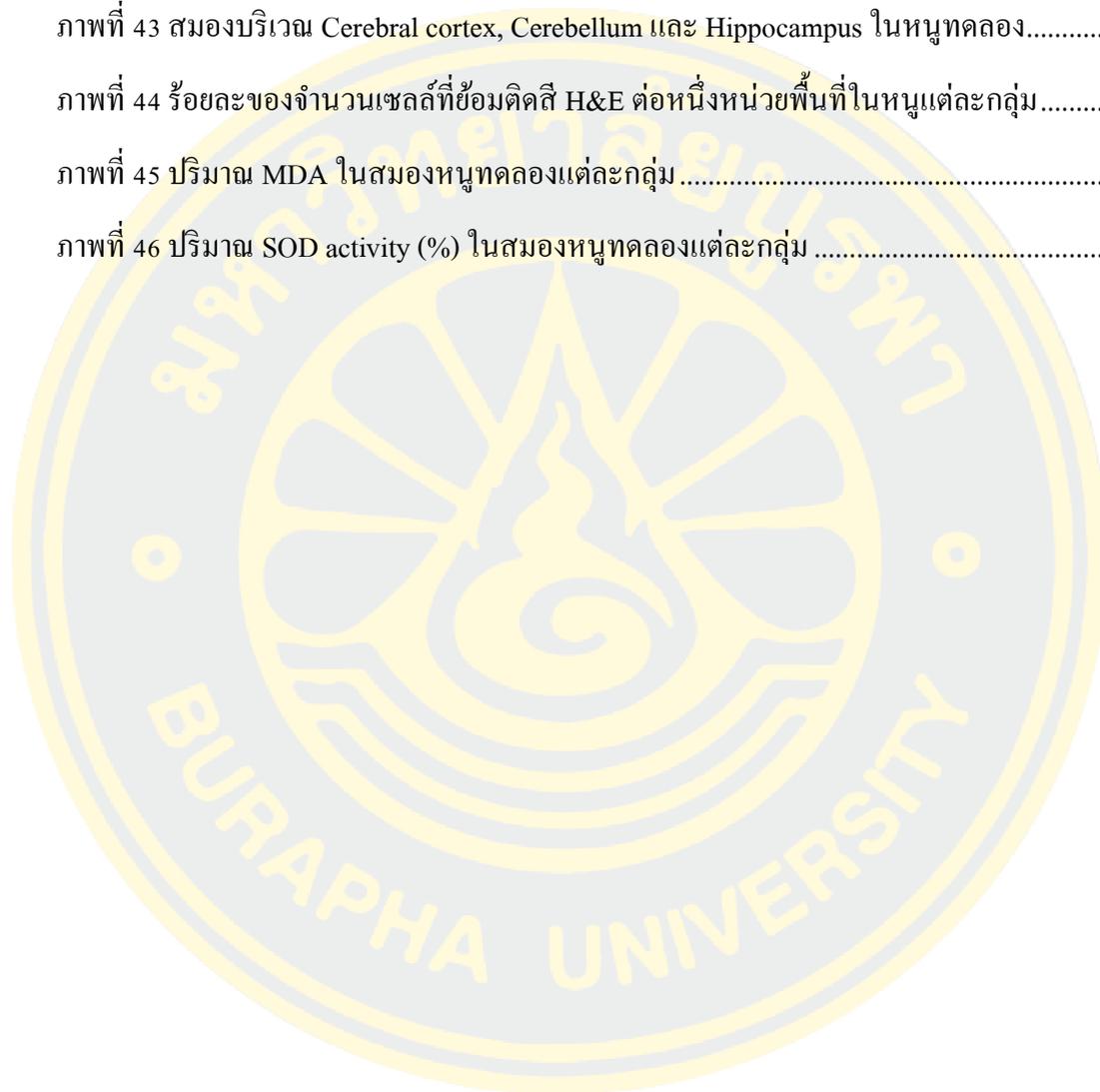
ภาพที่ 42 สมองบริเวณ Cerebral cortex, Cerebellum และ Hippocampus ในหนูทดลอง.....160

ภาพที่ 43 สมองบริเวณ Cerebral cortex, Cerebellum และ Hippocampus ในหนูทดลอง.....161

ภาพที่ 44 ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในหนูแต่ละกลุ่ม.....162

ภาพที่ 45 ปริมาณ MDA ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม.....165

ภาพที่ 46 ปริมาณ SOD activity (%) ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม167



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โลกมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสังคมโดยมีจำนวนประชากรผู้สูงอายุที่มีแนวโน้มสูงขึ้น จำนวนผู้สูงอายุที่มากขึ้นทำให้ตระหนักถึงคุณภาพชีวิตที่จะต้องดูแลให้สมบูรณ์แข็งแรง จากปัญหาด้านร่างกายที่มีการเสื่อมถอยลงเป็นปกติ ทำให้ผู้สูงอายุมีความเสี่ยงต่อการเจ็บป่วยที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวันและเกิดภาวะฟุ้งฟิงขึ้น ผู้สูงอายุทั่วไปมีการลดลงทางด้านการเรียนรู้และความจำอยู่แล้วจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท แต่ยังคงสามารถใช้ชีวิตประจำวันได้อย่างปกติ ในผู้สูงอายุบางรายมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยโดยไม่ทันสังเกต ก่อนที่จะรุนแรงเพิ่มมากขึ้นในระยะเวลาเพียงไม่นานจนกลายเป็นภาวะสมองเสื่อมในที่สุด เรียกช่วงรอยต่อของกระบวนการเรียนรู้ในผู้สูงอายุปกติกับผู้สูงอายุที่กลายเป็นภาวะสมองเสื่อมว่าเป็นความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (Mild cognitive impairment; MCI) (Anderson, 2019)

ความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI) เป็นการสูญเสียความสามารถของกระบวนการรู้คิดเพียงเล็กน้อย ซึ่งมักเกิดจากการเสื่อมของเซลล์ประสาทในสมอง (Neurodegeneration) โดยมีการสูญเสียความสามารถด้านความจำหรือมีปัญหาด้านอื่นตามหน้าที่ของโดเมนที่เสียหาย แต่จะไม่รุนแรงจนกระทบการใช้ชีวิตประจำวัน จากการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ พบว่า MCI มีความเกี่ยวข้องกับการฝ่อของปริมาตรสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส (Hippocampal) และสมองกลีบข้าง (Temporal lobe) (Cheng, Chen, & Chiu, 2017; Shang et al., 2018) และยังพบสารที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบและกระบวนการเกิดออกซิเดชัน เช่น Acute phase proteins (APPs), Cytokines, Cholesterol, Isoprostanes, Homocysteine, ApoE4 allele, A β 42 และ tau protein (Pillai et al., 2019)

กลไกการเกิด MCI ยังไม่ปรากฏอย่างแน่ชัด เนื่องจากกลไกมีความซับซ้อนและมีปัจจัยหลายอย่างที่เข้ามาแทรกแซง ทำให้การวิจัยส่วนมากจึงเน้นไปที่การลดปัจจัยเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นทั้งปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การลดการเกิดกระบวนการอักเสบ (Inflammation) และการเกิดความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) เช่น ยากลุ่ม NSAIDs วิตามิน C วิตามิน E รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งส่วนใหญ่มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และ โพลีฟีนอล (Polyphenols) เป็นส่วนประกอบ

การมีอายุยืนยาวอย่างมีสุขภาพดีเป็นสิ่งที่ทุกคนให้ความสนใจ โดยสิ่งที่รับประทานเข้าไป ต้องสามารถลดหรือชะลอความเสื่อมที่เกิดขึ้นในร่างกายได้ โดยเฉพาะในระดับเซลล์ได้ (ชุดิมน หมั่นแก้ว, ผลารัตน์ ตั้งเชื่อนขันธุ์, & สุพัชฌา พลอยงาม, 2555)

การใช้ยาอายุวัฒนะจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการใช้เพื่อชะลอความเสื่อมของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเสื่อมทางด้านความรู้และความจำ การแพทย์แผนไทยเป็นการแพทย์สาขาหนึ่งที่มีการใช้องค์ความรู้ในการดูแลสุขภาพคนไทยมาอย่างยาวนาน และได้มีการจัดบันทึกข้อมูลการรักษาเพื่อใช้ในการดูแลสุขภาพเจ็บป่วยและถ่ายทอดองค์ความรู้ ตามตำราการแพทย์แผนไทยมีการระบุตำรับยาอายุวัฒนะ (Longevity remedy) ไว้หลายตำรับ สรรพคุณถูกระบุเพียงว่า รับประทานแล้วจะมีอายุยืนยาว ร่างกายแข็งแรง ทำให้กลายเป็นจุดที่น่าสังเกตว่า การที่จะมีอายุยืนยาวแข็งแรงตามคำกล่าวในตำราทางการแพทย์แผนไทยนั้นต้องประกอบด้วยกลไกการตอบสนองต่อร่างกายอย่างไร และมีผลต่อกระบวนการเรียนรู้และความจำด้วยหรือไม่

ตำรับยาอายุวัฒนะที่ถูกกล่าวขานกันมาอย่างยาวนาน ได้แก่ ตำรับยาที่ประกอบด้วยเครื่องยา 6 ชนิด ได้แก่ เปลือกทังถ่อน (*Albizia procera* (Roxb.) Benth.) เปลือกตะโกนา (*Diospyros rhodcoalyx* Kurz) บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson) หัวหญ้าแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) เมล็ดข่อย (*Streblus asper* Lour.) และเมล็ดพริกไทย (*Piper nigrum* L.) ในอัตราส่วนที่เท่ากัน จากการศึกษาเครื่องยาเดี่ยวพบว่าเครื่องยาส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและต้านการเกิดออกซิเดชัน (สิริเพ็ญ เลื่อนเชย & สิริรัตน์ เตียงกุล, 2551) รวมถึงบางชนิดออกฤทธิ์ต่อการทำงานของระบบประสาท และเพิ่มพฤติกรรมการเรียนรู้ โดยฤทธิ์รวมของตำรับยาที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ถึง 67.35% (วริรัตน์ โสรส, อรัญญา ไทยกุล, & สุภัทสร วันสุทนะ, 2557)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาสรรพคุณของตำรับยาตามตำรายังไม่ปรากฏแน่ชัด เนื่องจากไม่สามารถระบุกลไกการทำงานที่เกิดขึ้นร่วมกันของเครื่องยาแต่ละตัวในตำรับได้ จึงเป็นจุดที่นักวิจัยให้ความสนใจในการศึกษาเพื่อพัฒนาตำรับยาต่อไป การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำนายกลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยาอายุวัฒนะโดยรวมต่อ MCI โดยอาศัยวิธีการทางคอมพิวเตอร์ในการช่วยทำนายสารออกฤทธิ์ ปฏิสัมพันธ์ และเป้าหมายของการออกฤทธิ์ เกิดการอธิบายกลไกเป็นโครงข่ายทางเภสัชวิทยา (Network pharmacology) นอกจากนั้นยังทำการตรวจสอบผลการทำนายกลไกของตำรับยาด้วยการศึกษาผลของตำรับยาอายุวัฒนะในเซลล์ประสาทและศึกษาด้านพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมของความจำและการเรียนรู้ ด้วยสาร D-galactose ซึ่งเร่งให้เกิดการแก่และตายของเซลล์ขึ้นจากการเพิ่มความเครียดออกซิเดชันและการอักเสบของเซลล์

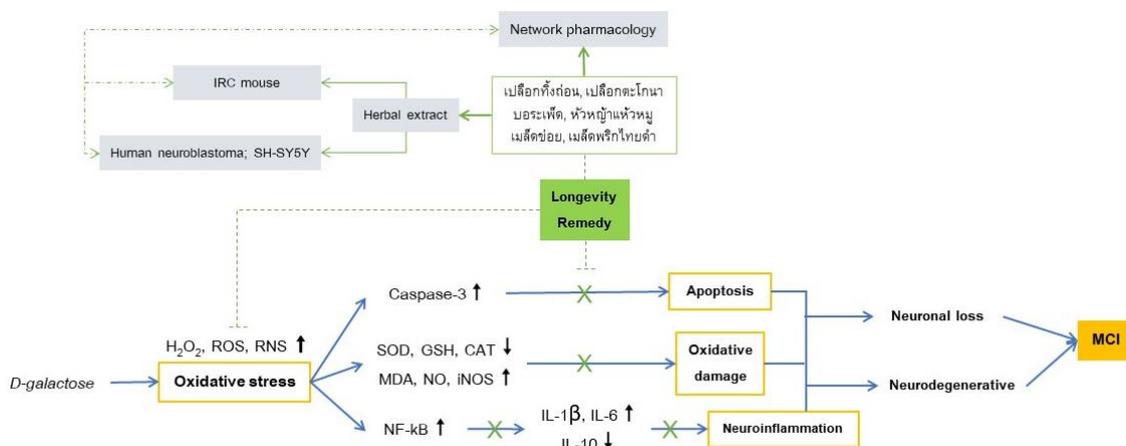
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาโครงข่ายทางเภสัชวิทยา (Network pharmacology) ของตำรับยาอายุวัฒนะในการป้องกันการเกิด MCI ผ่านการทำนายสารออกฤทธิ์ (Active compounds) เป้าหมาย (Drug targets) ปฏิสัมพันธ์ (Drug interactions) และวิถี (Pathways) ที่เกี่ยวข้อง ด้วยวิธีการทางคอมพิวเตอร์ (*in silico*)
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ ในการต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ป้องกันการเสื่อมในเซลล์ประสาท (Neuroblastoma; SH-SY5Y) ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม ด้วยวิธีการทางหลอดทดลอง (*in vitro*)
3. เพื่อศึกษาพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI ด้วย D-galactose หลังจากได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (*in vivo*)
 - 3.1 ศึกษาพฤติกรรมด้านความจำเกี่ยวกับทิศทางและสถานที่ (Spatial memory) ด้วย Morris water maze test (MWM)
 - 3.2 ศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทในสมองหนูทดลอง และตรวจสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในกลไก

สมมติฐานของการวิจัย

1. โครงข่ายทางเภสัชวิทยา (Network pharmacology) ของตำรับยาอายุวัฒนะสามารถทำนายกลไกการเกิด MCI โดยสารออกฤทธิ์ของตำรับยาอายุวัฒนะแต่ละตัวจะไม่หักล้างฤทธิ์กัน และสามารถเข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (Inflammation) และ/หรือกระบวนการเกิดความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ได้
2. สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดการอักเสบ และ/หรือ การเกิดความเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาท (Human neuroblastoma; SH-SY5Y) ได้
3. พฤติกรรมด้านความจำเกี่ยวกับทิศทางและสถานที่ (Spatial memory) ในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI ด้วย D-galactose ดีขึ้น หลังจากได้รับการป้อนสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ โดยเซลล์ประสาทในหนูกลุ่มทดลองมีอัตราการรอดชีวิตที่มากกว่ากลุ่มควบคุม และตรวจสอบพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องในกลไกการเกิด MCI

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ภาพที่ 1 การศึกษาผลของตำรับยาอายุวัฒนะในการป้องกันการเกิดความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI) จากการเหนี่ยวนำด้วยสาร D-galactose

การศึกษาค้นคว้าของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในการป้องกันการเกิดความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI) จากการเหนี่ยวนำของสาร D-galactose ทำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาท จากกลไกการเพิ่มความเครียดออกซิเดชัน ส่งผลให้เกิดการตายและการอักเสบของเซลล์ สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะสามารถยับยั้งกลไกที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์จาก D-galactose โดยทำการศึกษาค้นคว้าด้วยคอมพิวเตอร์ในการทำนายกลไกและสร้างเป็นโครงข่ายทางเภสัชวิทยา จากนั้นนำไปศึกษาฤทธิ์ต่อในหลอดทดลองและในเซลล์ประสาท (Human neuroblastoma; SH-SY5Y) เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ประสาท ก่อนนำไปสู่การศึกษาระดับพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI และตรวจสอบฤทธิ์ในการป้องกัน MCI ผ่านสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. แนวทางการศึกษาการออกฤทธิ์ของตำรับยาอายุวัฒนะ ผ่านวิธีการทางโครงข่ายทางเภสัชวิทยา (Network pharmacology) ในการทำนายประสิทธิภาพโดยรวมของตำรับ ก่อนนำไปสู่การทดลองในขั้นต่อไป
2. แนวทางการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทด้วยตำรับยาอายุวัฒนะ ผ่านกลไกการอักเสบและการต้านออกซิเดชัน
 - 2.1 รูปแบบพฤติกรรมของหนูทดลองเมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI และแนวทางการยับยั้งการเกิด MCI ในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย D-galactose

2.2 นำไปสู่การพัฒนาตำรับยาอายุวัฒนะเป็นอาหารเสริมสำหรับการชะลอความเสื่อมของร่างกาย

ขอบเขตของการวิจัย

1. สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ ประกอบด้วยเครื่องยา 6 ชนิด ได้แก่ เปลือกทังถ่อน เปลือกตะโกนา เถาบระเพ็ด หัวหญ้าแห้วหมู เมล็ดข่อย และเมล็ดพริกไทยดำ นำมาบดในปริมาณที่เท่ากัน และสกัดด้วย 95% เอทานอล
2. เซลล์ประสาทชนิด Human neuroblastoma; SH-SY5Y cell line ใช้สำหรับศึกษาการเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาท
3. หนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR (Imprinting Control Region) เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักตัวเฉลี่ย 30-50 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 32 ตัว ทุกตัวต้องอยู่ในสภาพสภาวะแวดล้อมเดียวกัน ได้รับอาหาร และน้ำสะอาดอย่างอิสระ (add libitum) ในปริมาณที่เท่ากันก่อนการทดลอง
4. สาร D-galactose เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาทและหนูทดลอง จากการเพิ่มความเครียดออกซิชั่นและการอักเสบของเซลล์ประสาท
5. การทำนายสารออกฤทธิ์ โปรตีนเป้าหมาย ปฏิสัมพันธ์ และวิถีระหว่างเครื่องยาในตำรับยา และการเกิด MCI โดยสร้างเป็นโครงข่ายทางเภสัชวิทยาด้วยวิธีการทางคอมพิวเตอร์
6. การเปรียบเทียบผลของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะต่อการป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาท SH-SY5Y โดยทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เทียบกับสารควบคุม
7. การเปรียบเทียบผลของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะต่อการเกิด MCI ในหนูทดลอง โดยทำการทดสอบด้วยเครื่องมือวัดการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองเทียบกับกลุ่มควบคุม
8. ตัวแปรที่ศึกษา

ระยะที่ 1

ตัวแปรต้น : โครงสร้างทางเคมีของเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะ

ตัวแปรตาม : วิถี (Pathways) ที่มีนัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับ MCI

ระยะที่ 2

ตัวแปรต้น : สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

ตัวแปรตาม : ฤทธิ์ในการป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาท

ตัวแปรควบคุม : เซลล์ประสาท (Human neuroblastoma; SH-SY5Y) ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย D-galactose

ระยะที่ 3

ตัวแปรต้น : สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

ตัวแปรตาม : พฤติกรรมการเรียนรู้และความจำของหนูทดลอง

ตัวแปรควบคุม : หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย D-galactose

นิยามศัพท์เฉพาะ

ความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (Mild cognitive impairment: MCI)

หมายถึง ภาวะที่มีการสูญเสียกระบวนการรู้คิดเล็กน้อย แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวัน เป็นช่วงรอยต่อของการเกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่างผู้สูงอายุปกติกับผู้สูงอายุที่จะกลายเป็นภาวะสมองเสื่อม

ตำรับยาอายุวัฒนะ (Anti-aging remedy: AAR) หมายถึง ตำรับยาที่ประกอบด้วยเครื่องยาที่ได้จากสมุนไพรแห้ง 6 ชนิด ได้แก่ เปลือกกิ่งถ่อน เปลือกตะโกนา เถาบอระเพ็ด หัวหญ้าแห้วหมู เมล็ดข่อย และเมล็ดพริกไทยดำ ในปริมาณที่เท่ากัน ได้จากจากตำรายาพิเศษของพระเจ้าบรมวงศ์เธอ กรมสมเด็จพระปวงเรศวริยาลงกรณ์

ฤทธิ์ของตำรับยา (Effect of longevity remedy) หมายถึง ฤทธิ์ในการป้องกันการเกิด MCI ผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และกลไกที่เกี่ยวข้องกับความเครียดออกซิเดชัน

การป้องกันความผิดปกติของความสามารถของสมอง (Prevention of mild cognitive impairment) หมายถึง การปกป้องและ/หรือชะลอการเกิด MCI ในด้านโครงสร้างและหน้าที่ เช่น การเพิ่มสารกำจัดอนุมูลอิสระ การลดการอักเสบ การลดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ เป็นต้น

โครงข่ายทางเภสัชวิทยา (Network pharmacology) หมายถึง โครงข่ายที่สร้างขึ้นเพื่อทำนายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะกับเป้าหมายในกลไกการเกิด MCI ผ่านวิธีการทางคอมพิวเตอร์

เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture) หมายถึง เซลล์ประสาทชนิด Human neuroblastoma: SH-SY5Y ใช้ศึกษาการเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาท

หนูทดลอง (Imprinting Control Region: ICR Mouse) หมายถึง หนูเมาส์ สายพันธุ์ทางสืบพันธุ์ เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย 30-50 กรัม

ดีกาแลคโตส (D-galactose) หมายถึง สารเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากการเพิ่มของความเครียดออกซิเดชันและการอักเสบของเซลล์ประสาท เกิดทำงานที่ผิดปกติของเซลล์และเร่งให้เกิดการแก่และการตายขึ้น สามารถใช้ทดสอบได้ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในหนูทดลอง

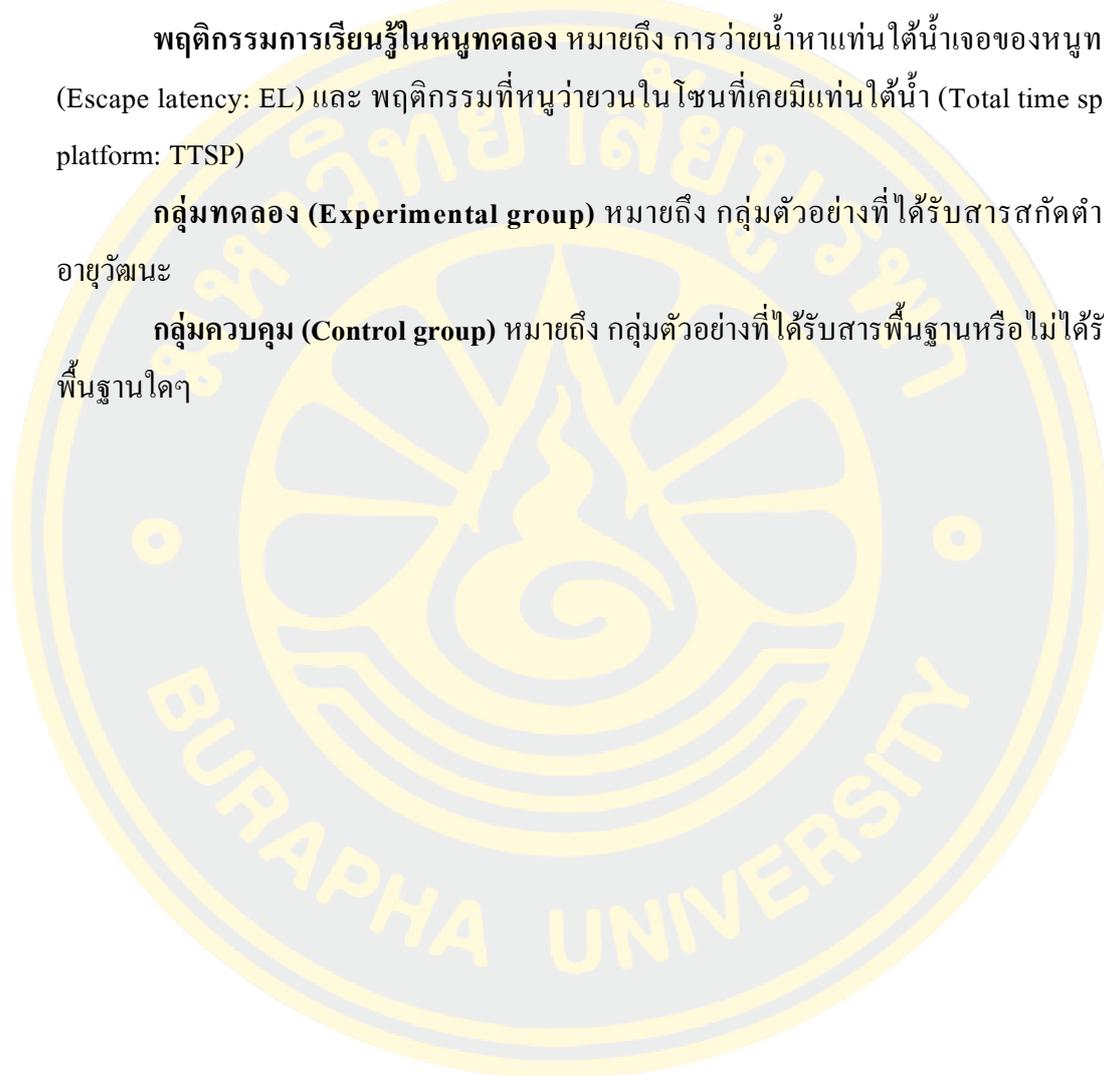
การทดสอบมอริสวอเตอร์เมท (Morris Water Maze Test) หมายถึง การทดสอบการเรียนรู้และความจำในหนูทดลอง ด้วยเครื่องมือ Morris Water Maze

Morris Water Maze (MWM) หมายถึง อุปกรณ์ในการทดสอบการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับทิศทางและสถานที่ โดยให้หนูว่ายน้ำในอ่างทรงกลมเพื่อหาแท่นไดน้ำ

พฤติกรรมการเรียนรู้ในหนูทดลอง หมายถึง การว่ายน้ำหาแท่นไดน้ำเจอของหนูทดลอง (Escape latency: EL) และ พฤติกรรมที่หนูว่ายวนในโซนที่เคยมีแท่นไดน้ำ (Total time spent in platform: TTSP)

กลุ่มทดลอง (Experimental group) หมายถึง กลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

กลุ่มควบคุม (Control group) หมายถึง กลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสารพื้นฐานหรือไม่ได้รับสารพื้นฐานใดๆ



บทที่ 2

แนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research design) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิผลของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่มีผลต่อการป้องกันการเกิดความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI) ผ่านกลไกความเครียดออกซิเดชัน โดยทำการทำนายผลในคอมพิวเตอร์ (*in silico*) ศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (*in vitro*) และศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยมีแนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

ความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI)

อาการและอาการแสดง

การดำเนินโรคและความรุนแรง

การตรวจประเมิน

กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิด MCI

การอักเสบ

การเกิดความเครียดออกซิเดชัน

กลไกอื่นที่เกี่ยวข้อง

แนวทางการรักษา MCI

การรักษาด้วยการใช้ยา

การรักษาด้วยวิธีการอื่น ๆ

ตำรับยาอายุวัฒนะ

สมุนไพรในตำรับยาอายุวัฒนะ

ทังก่อน

ตะโกนา

บอระเพ็ด

แห้วหมู

ข่อย

พริกไทยดำ

การบ่งชี้เครื่องยาด้วยวิธีการ โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง

ชนิดของน้ำยาพ่น

การค้นหาและพัฒนาฯ

การออกแบบฯ

โครงข่ายทางเภสัชวิทยา

โปรแกรมสำเร็จรูป

ฐานข้อมูลสาธารณะ

การศึกษาระดับพรีคลินิก

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาตำรับยากับการสร้างโครงข่ายทางเภสัชวิทยา

การศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y

การศึกษาในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม

ความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง

ความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง หรือ Mild cognitive impairment (MCI) เป็นช่วงรอยต่อของการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการคิดระหว่างผู้สูงอายุปกติกับผู้สูงอายุที่มีภาวะสมองเสื่อม เกิดขึ้นได้ประมาณร้อยละ 10-15 ของประชากรที่มีอายุมากกว่า 65 ปี (Lo, 2017) ในผู้สูงอายุการลดลงของความสามารถในการรู้คิดเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างปกติ โดยน้ำหนักของสมองจะค่อยๆ ลดลงประมาณร้อยละ 2-3 ของน้ำหนักตัวในทุก ๆ 10 ปีหลังจากอายุ 50 ปี และลดลงถึง 10% เมื่ออายุ 80 ปี เทียบกับวัยหนุ่มสาว (Drachman, 2006) จากความเสื่อมของเซลล์ประสาท (Neurodegenerative) ทำให้โครงสร้างและหน้าที่ของสมองมีการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะบริเวณสมองกลีบข้าง (Parietal area) สมองส่วนหน้า (Prefrontal area) และสมองกลีบขมับ (Temporal area) (Bassett & Sporns, 2017; von Bernhardi, Eugenín-von Bernhardi, & Eugenín, 2015)

อาการและอาการแสดง

ความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI) เป็นอาการที่มีการสูญเสียความสามารถทางกระบวนการคิดเพียงเล็กน้อย มีการหลงลืมบ่อยครั้ง โดยมักจะลืมในสิ่งที่ไม่ควรลืม และเกิดขึ้นประจำจนรบกวนการทำงาน ส่วนใหญ่ไม่สามารถรับรู้การเปลี่ยนแปลงนี้ได้ด้วยตนเองรู้แต่เพียงว่าตนเองความจำไม่ดี คนรอบข้างสามารถสังเกตและรับรู้ได้จากการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับความทรงจำ ซึ่งความจำที่เสียหายนี้จะป็นอิสระต่อความสามารถในการทำงานด้านอื่น ๆ อาจจะมีการสูญเสียความสามารถของสมองในแบบใดแบบหนึ่ง หน้าที่ของกระบวนการรู้คิดส่วนใหญ่ยังคงทำหน้าที่ได้ปกติ ไม่มีภาวะสมองเสื่อม และไม่ส่งผลกระทบต่อชีวิตประจำวัน

ผู้สูงอายุที่เป็น MCI ยังคงสามารถทำกิจกรรมต่างๆ ในชีวิตประจำวันได้ดี รวมถึงการคิด (Thinking) การปรับตัว (Orientation) ความเข้าใจ (Comprehension) การคิดคำนวณ (Calculation) ความสามารถในการเรียนรู้ (Learning capacity) ภาษา (Language) และการตัดสินใจ (Judgement) ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อสติสัมปชัญญะ (Consciousness) และจะไม่แสดงอาการของการสูญเสียการเข้าสังคมที่ชัดเจนเหมือนภาวะสมองเสื่อม แต่ยังคงมีความบกพร่องมากกว่าคนปกติที่อยู่ในวัยและระดับการศึกษาระดับเท่ากัน (กรมการแพทย์, 2557)

การดำเนินโรคและความรุนแรง

ความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI) เป็นหนึ่งในอาการเริ่มต้นของภาวะสมองเสื่อม (Dementia) และสามารถดำเนินเข้าสู่อาการที่รุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้สูงอายุที่มีความผิดปกติที่เด่นชัดด้านความจำ มีโอกาสพัฒนาเป็นโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) อย่างรวดเร็วภายใน 5 ปี คิดเป็นร้อยละ 10-15 ของผู้สูงอายุที่มีอาการ MCI โดยความรุนแรงของอาการจะเพิ่มมากขึ้นตามพยาธิสภาพจนกระทั่งกระทบต่อการดำรงชีวิตประจำวัน ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านพฤติกรรม (Behavior) อารมณ์ (Emotional) และบุคลิกภาพ (Personality) แต่ไม่มีผลกระทบต่อสติสัมปชัญญะ (Consciousness) (World Health Organization, 2019; กรมการแพทย์, 2557)

การตรวจประเมิน

การตรวจประเมินหน้าที่การรู้คิด (Cognitive function) ใน MCI สามารถประเมินได้ทางคลินิก และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยการประเมิน MCI จะต้องไม่ประเมินระหว่างการเกิดภาวะสับสน (Delirium) หรืออยู่ในภาวะที่ไม่สามารถอธิบายได้ภายใต้เงื่อนไขอื่น เช่น ภาวะซึมเศร้า เป็นต้น

การประเมินทางคลินิก เน้นซักประวัติเกี่ยวกับอาการปัจจุบันและประวัติส่วนตัว ร่วมกับการใช้เครื่องมือคัดกรองภาวะสมองเสื่อม เช่น Thai mental state examination (TMSE), Mini-mental state examination (MMSE) ผลการประเมินพบว่า มีความผิดปกติทางกระบวนการรู้คิด แต่ยังไม่เข้าเกณฑ์การวินิจฉัยว่าเป็นภาวะสมองเสื่อม อย่างไรก็ตามผลความผิดปกติสามารถบ่งชี้ถึงสิ่งสำคัญหรือลักษณะทางพยาธิสภาพบางอย่างได้

การประเมินทางห้องปฏิบัติการ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัย MCI และ AD (Song, Poljak, Smythe, & Sachdev, 2009) โดยพบการฝ่อของปริมาตรสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) และสมองกลีบข้าง (Temporal lobe) (Cheng et al., 2017; Shang et al., 2018) พบเส้นใยภายในเนื้อสมองมีการซึมผ่านและไขว้กันลดลง แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องกับการลดลงของความจำและเปราะบางต่อการกลายเป็น AD (Reas et al., 2018) นอกจากนี้ยังพบสารบ่งชี้ทาง

ชีวภาพ เช่น Acute phase proteins (APPs), Cytokines, Cholesterol, Isoprostanes, Homocysteine, ApoE4 allele, A β 2 และ tau protein ด้วย (Pillai et al., 2019)

กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิด MCI

จากผลการศึกษาทางคลินิกและห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นถึงปริมาณเนื้อสมองที่ลดน้อยลงในผู้ที่เป็ MCI สาเหตุหนึ่งเกิดจากการตายของเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นการเสื่อมสภาพที่ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ ทำให้หน้าที่ในการสร้างสารให้พลังงานแก่เซลล์ (Adenosine triphosphate; ATP) เสียไป เกิดการเสียสมดุลและแตกสลายผ่านกระบวนการ Apoptosis และ Necrosis ของเซลล์ประสาท ซึ่งมีความเกี่ยวข้องข้องกับกระบวนการอักเสบและการเกิดความเครียดออกซิเดชัน มีหลักฐานอย่างแน่ชัดว่า Inflammatory reaction สามารถกระตุ้น Oxidative damage ในการเกิดพยาธิสภาพของกระบวนการเสื่อมของระบบประสาทได้ และ Inflammatory response ยังถูกควบคุมโดย Oxidative stress อีกด้วย

การอักเสบ

การอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายมีการตอบสนองต่อการบาดเจ็บ เมื่อถูกกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายในและภายนอกร่างกาย ทำให้เกิดการดักจับสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาทำอันตรายต่อร่างกาย และกระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ การอักเสบถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นเมื่อระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) ได้รับความเสียหายจากตัวกระตุ้น ระบบจึงจะต้องกระตุ้นให้เกิดการอักเสบเพื่อคงสภาพความสมดุลของร่างกายไว้ แต่หากกระบวนการอักเสบไม่สามารถควบคุมได้ จะส่งผลให้มีการผลิตสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ขึ้น และทำให้เกิดพยาธิสภาพของการเสื่อมได้

การอักเสบมีความสัมพันธ์กับการเสื่อมของเซลล์ประสาท โดยการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบมีความเกี่ยวข้องข้องกับเซลล์ไมโครเกลีย (Microglia) และแอสโตรไซต์ (Astrocytes) ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทที่พบในสมอง ซึ่งพบกระบวนการการตอบสนองต่อเซลล์เบื้องต้น (Innate inflammatory response) และพบสารที่เป็นองค์ประกอบของการอักเสบภายในเซลล์ (Inflammatory components) (Tangestani Fard & Stough, 2019) พยาธิสภาพจะเกิดตามตำแหน่งของการเกิดโรคเมื่อมีตัวเหนี่ยวนำมากระตุ้น จะทำให้เกิดการทำงานของ sensors, transducers และ effectors ส่งผลให้มีการขยายสัญญาณการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบเพื่อเรียกเซลล์ต่าง ๆ ไปยังตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (Neurotoxicity) รวมไปถึงการตายของเซลล์ประสาท (Neuronal death)

ไมโครเกลีย (Microglia) มีบทบาทสำคัญในการสร้างและควบคุมการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ในบริบทของโรคระบบประสาทเสื่อม โดยทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมในระบบประสาท ในสภาวะปกติไมโครเกลียจะอยู่ในรูปที่ไม่กระตุ้น (Deactivated) ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้าง Anti-inflammatory factors และ Neurotrophic factors แต่เมื่อมีการลุกล้ำของเชื้อมะเร็งหรือมีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ จะเปลี่ยนเป็นรูปที่สามารถกระตุ้น (Activated) ส่งผลให้เกิดการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางการอักเสบ (Inflammatory mediators) เช่น TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ซึ่งมีผลต่อ Astrocytes ให้เหนี่ยวนำการเกิดการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบทุติยภูมิ (Secondary inflammatory responses) ขึ้น โดยมีการอาศัยสารสื่อกลางต่าง ๆ ได้แก่ Cytokines, ROS และ NO เป็นต้น ซึ่งจัดว่าเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท และหากมีการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบนาน ๆ นำไปสู่การเกิดการเสื่อมของระบบประสาทได้

ระดับของ IL-1 β และ TNF- α มีความเกี่ยวข้องกับการขาดของความสนใจ ความจำ การปรับตัว และมีติสัมพันธ์ที่ขึ้นอยู่กับการมองเห็นส่วน Hippocampus (Baierle et al., 2015) และการมีระดับ IL-1 β ที่สูงในระยะยาวมีความสัมพันธ์กับการเสียหายของความจำในหนูแก่

ความเครียดออกซิเดชัน

ความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) เป็นภาวะที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระ (Free radical) ในปริมาณที่มากเกินไป จากกระบวนการเมตาบอลิซึมแบบออกซิเดชันของเซลล์ทำให้ระบบต้านอนุมูลอิสระในร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ เกิดการสร้างสารที่ไวต่อปฏิกิริยาขึ้น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H₂O₂) สารกลุ่ม Reactive oxygen species (ROS) สารกลุ่ม Reactive nitrogen species (RNS) เป็นต้น สารเหล่านี้เข้าทำปฏิกิริยากับไขมันในร่างกาย โดยเข้าจับกับสารพวกกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดหลายตำแหน่ง (Polyunsaturated fatty acids; PUFA) เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด (Lipid peroxidation) จนเกิดเป็น มาลondiอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde; MDA) และเข้าทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของเบส โดยการเข้าทำปฏิกิริยาที่พันธะคู่ของ DNA สายเบส (Thymine; T และ Guanine; G) นำไปสู่การเสียหายเกิดการทำลายสายของดีเอ็นเอ (DNA) หากเกิดในตำแหน่งออกฤทธิ์ (Active site) ทำให้โปรตีนก่อนนั้นไม่สามารถทำตามหน้าที่ได้ปกติ (Ronald C Petersen & Negash, 2008)

การเกิดความเครียดออกซิเดชัน มีความเกี่ยวข้องกัน 2 กลไกหลักซึ่งสัมพันธ์กับการเสื่อมถอยของระบบภูมิคุ้มกัน (Immunosenescence) ได้แก่ การลดลงของหน้าที่ของเซลล์ เนื่องจากเกิดการทำลายแบบออกซิเดชันต่อโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบพื้นฐานของเซลล์ และการตายของเซลล์ จากการสะสมของโมเลกุลที่ถูกออกซิไดซ์ นอกจากนั้นยังเกี่ยวข้องกับ

ปริมาณของเอนไซม์ที่ตอบสนองต่อการกำจัดอนุมูลอิสระที่ลดลงในเซลล์แก่อีกด้วย (Tangestani Fard & Stough, 2019)

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (Unpaired electron) อยู่ในวงโคจรทำให้ไม่เสถียร โดยจะเข้าไปแย่งจับและดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวเองเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่และเข้าทำปฏิกิริยากับสาร โมเลกุลอื่น ๆ ต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) ต่อกันไปเรื่อย ๆ ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก เช่น การก่อเปอร์ออกซิเดชันของลิพิด (lipid peroxidation) นำไปสู่การทำลายลิพิดในเซลล์เมมเบรนอย่างต่อเนื่องและถูกทำลาย เกิดการรั่วของไอออนและเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ระหว่างในเซลล์ออกนอกเซลล์ ทำให้เซลล์เสียหายได้

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นอย่างปกติภายในร่างกาย จากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิดการขนส่งอิเล็กตรอนผ่านตัวรับหลายตัว (Electron transport chain) ตามความเข้มข้นของพลังงานจนกระทั่งตัวรับตัวสุดท้าย ซึ่งในขณะที่ขนส่งอิเล็กตรอนมีโอกาสนหลุดออกมาจากกระบวนการกลายเป็นอิเล็กตรอนที่ไม่เสถียรขึ้น สารที่เกิดขึ้นมีบทบาททั้งที่จำเป็นสำคัญต่อร่างกายและอีกด้านหนึ่ง ถ้าไม่สามารถควบคุมปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น จะก่อการบาดเจ็บ เกิดโรคขึ้นได้ ดังนั้นจึงมีระบบต้านออกซิเดชันที่ทำงานเพื่อป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ โดยลดระดับอนุมูลอิสระในร่างกาย เช่น ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ ทำลาย/ยับยั้งอนุมูลอิสระ และทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุด สารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) สามารถแยกเป็น 2 ลักษณะ ได้แก่

- 1) กลุ่มป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT), Peroxidase, Cytochrome C peroxidase
- 2) กลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ ได้แก่ วิตามินอี เบต้าแคโรทีน วิตามินซี ubiquinone, uric acid, bilirubin, albumin, sulfhydryl groups ในกรดอะมิโน cysteine ใน เนื้อสัตว์ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) และสารกลุ่ม flavonoids

กลไกอื่นที่เกี่ยวข้อง

อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase: AChE) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสลาย Acetylcholine (ACh) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท (Neurotransmitter) ที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการเรียนรู้และความจำ โดย ACh จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ AChE ได้ choline และ acetate จากนั้น choline จะถูกนำกลับเข้าสู่ presynaptic terminal เพื่อนำไปสร้าง ACh ใหม่ หากมีปริมาณของ

AChE ที่มากเกินไป หรือมีปริมาณ ACh ที่ลดลงจะส่งผลกระทบต่อระบบการเรียนรู้และความจำได้ (Herholz, 2008)

เบต้า-อะไมลอยด์

MCI มีการสะสมของเบต้า-อะไมลอยด์ (β -amyloid: $A\beta$) ซึ่งเกิดขึ้นจากการเมตาบอลิซึมของ amyloid precursor protein (APP) โดยผ่านเอนไซม์ β -secretase และ γ -secretase โดยจะกระตุ้น Microglia ให้ส่งสัญญาณให้เกิดการเหนี่ยวนำ transcription factors ได้แก่ NF- κ B และ AP-1 กระตุ้นให้เกิดการสร้าง ROS และทำให้เกิดการแสดงออกของ inflammatory mediators ต่าง ๆ เช่น cytokines (TNF- α และ IL-1 β) โดยจะมีผลโดยตรงต่อ Cholinergic neurons และสามารถกระตุ้น astrocytes เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิด neurotoxic effects อีกด้วย (Han, El Omri, Sasaki, & Isoda, 2015) โดย $A\beta$ เป็นจุดเด่นหลักทางพยาธิวิทยาของ AD ซึ่งจากการศึกษาทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองยืนยันว่า oligomeric $A\beta$ แสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท และยังแสดงชัดในผู้ที่เป็ AD (Han et al., 2015)

แนวทางการรักษา MCI

ในปัจจุบันนักวิจัยและแพทย์ให้ความสำคัญในการรักษา MCI อย่างมากเพื่อยับยั้งการเกิดโรคหรือชะลออาการก่อนที่จะพัฒนาไปสู่ภาวะสมองเสื่อม (Anderson, 2019) โดยยังไม่มียาเฉพาะโรคในการรักษา MCI ให้หายขาด การรักษาส่วนใหญ่จึงเป็นการรักษาตามอาการเพื่อคงการทำงานของสมองไว้ให้นานที่สุด (Eshkoor, Hamid, Mun, & Ng, 2015) สามารถแบ่งแนวทางการรักษาออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1) ป้องกันไม่ให้สัมผัสปัจจัยเสี่ยงหรือการให้ภูมิคุ้มกันต่อปัจจัยเสี่ยงนั้น มักเป็นวิธีการดูแลตนเองในชีวิตประจำวัน เช่น การลดความเครียด การนอนหลับ การรับประทานอาหารหรือวิตามินเสริม การออกกำลังกาย การทำงานอดิเรก รวมถึงการเข้าสังคม

2) คัดกรองโรคตั้งแต่ยังไม่แสดงอาการ เพื่อที่จะให้การรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มแรก โดยการใช้แบบทดสอบเพื่อคัดกรองหาภาวะสมองเสื่อมและการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ

3) รักษาเพื่อชะลอ MCI ไม่ให้ก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว ด้วยการปฏิบัติตัวร่วมกับการรับประทานยา

การรักษาบางส่วนมีคุณสมบัติในการลดความเสี่ยงของการอักเสบและการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้กับการรักษา MCI ได้ (Tangestani Fard & Stough, 2019) อย่างไรก็ตามผู้ป่วยบางรายที่มีอาการดีขึ้นหรือหายไปจนกลับมาสู่ภาวะปกติโดยไม่ต้องใช้ยา เมื่อประเมินติดตามหน้าที่ของกระบวนการรู้คิด (กรมการแพทย์, 2557)

การรักษาด้วยการใช้ยา

สมาคมประสาทวิทยา (American Academy of Neurology; AAN) ให้ข้อมูลในการใช้ยาในการรักษา MCI ได้แก่ Donepezil, Galantamine, Rivastigmine (Ronald C. Petersen et al., 2018) ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม Acetylcholinesterase Inhibitor ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ที่ใช้ในการทำลาย acetylcholine ทำให้มีระดับความเข้มข้นของ acetylcholine ในระบบประสาทเพิ่มมากขึ้น และอาจมีผลในการลดการเกิด Amyloid precursor protein ป้องกันผลจากอนุมูลอิสระและการตายของเซลล์ประสาท (ก้องเกียรติ ภูณัทกันทราร, 2557)

นอกจากนั้นยังใช้วิธีการยับยั้งการตอบสนองต่อการอักเสบโดยใช้ยาในกลุ่มต้านการอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) โดยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase (COX) ที่เป็นเป้าหมายของการเกิดกระบวนการอักเสบและกระตุ้นที่ Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- γ) เกิดการเหนี่ยวนำส่งผลให้การสร้าง A β ลดลง ในยาบางตัวสามารถลดการถอดรหัสของ iNOS ในเกลียเซลล์ (Glial cell) ลดสารสื่อกลางการอักเสบ (Inflammatory mediators) ลดการเกิดพิษในเซลล์ประสาท (Neurotoxic และการยับยั้งใน Nuclear factor (NF)- κ B pathway

การรักษาด้วยวิธีการอื่นๆ

สารต้านการเกิดออกซิเดชัน (Antioxidants) มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการเกิด Oxidative damage โดยสามารถช่วยลดการเกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาทได้ เช่น วิตามิน E (Vitamin E) สามารถลด microglia activation ในระบบประสาทและยังช่วยลดระดับ PGE2 และ COX activity นอกจากนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และสารกลุ่ม flavonoids ที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน

สารจากธรรมชาติ (Natural products) สารจากธรรมชาติหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ เช่น แป๊ะก๊วย (Ginkgo biloba) สามารถลดการ activation ของ macrophage ได้ และลดสารสื่อกลางการอักเสบ ได้แก่ iNOS, COX-2 และ TNF- α

ใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน (Estrogen replacement therapy; ERT) เอสโตรเจนมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความสามารถทางารูคิด และป้องกันการลดลงของกระบวนการรูคิด โดยมีผลต่อความยืดหยุ่นของเดนไดรต์ (Dendritic plasticity) และกระบวนการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ (Neurogenesis)

ตำรับยาอายุวัฒนะ

การมีอายุที่ยืนยาวพร้อมกับการมีสุขภาพที่ดีเป็นสิ่งที่ปรารถนาของคนทั่วไป แนวทางการศึกษาในปัจจุบัน ได้แก่ การทำให้อายุไขยืนยาวขึ้น (Lifespan extension) และ/หรือ การทำให้เป็นหนุ่มสาวมากขึ้น (Rejuvenation) ความชราของเซลล์มีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนเทโลเมียร์ (Telomeres) ที่อยู่ส่วนปลายของโครโมโซม ซึ่งจะสั้นลงในทุกๆ ครั้งที่เซลล์มีการแบ่งตัว ทำให้เซลล์แก่และตายลง นอกจากนั้นภาวะที่ร่างกายเกิดความเครียดออกซิเดชันจะสร้างความเสียหายให้กับเซลล์

ยาอายุวัฒนะต้องเป็นยาที่สามารถลดหรือชะลอความเสื่อมที่เกิดขึ้นของร่างกายในระดับเซลล์ได้ เช่น เพิ่มความสามารถของร่างกายให้ทนทานต่อภาวะความเครียดในระดับเซลล์ การเพิ่มประสิทธิภาพของการซ่อมแซมและการทำงานของเซลล์ นอกจากจะยืดอายุให้ยืนยาวยังเพิ่มคุณภาพชีวิตได้ด้วย โดยสารที่ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ ชะลอความแก่อาจมีฤทธิ์เป็นสารต้านการอักเสบ สารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา เช่น ภาวะสมองเสื่อม (Dementia) เป็นต้น หลักการออกฤทธิ์ของสารที่มีสรรพคุณเป็นยาอายุวัฒนะสามารถเป็นไปได้ทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกระบวนการแก่ของเซลล์ เช่น สารบางชนิดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่สารบางชนิดไปกระตุ้นการทำงานของวิถีการอยู่รอดของเซลล์ เป็นต้น

สารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์เป็นยาอายุวัฒนะ เช่น สารกลุ่ม Polyphenols (flavonoid, flavonones, flavones, flavonols and isoflavones) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสามารถลดการถูกทำลายของดีเอ็นเอและลดการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis เนื่องจากภาวะเครียดออกซิเดชันได้, สารกลุ่ม phenols เช่น สาร Resveratrol มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ ชะลอความแก่ ลดการบาดเจ็บของ DNA, สาร Alkaloid ลดการสะสมของ β -amyloid ซึ่งอาจใช้ชะลอความเสื่อมของสมองได้ (Dechakhamphu, 2560)

ตามตำราโบราณมีการกล่าวถึงยาอายุวัฒนะไว้หลายตำรับ และปัจจุบันมีผู้ที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย บางตำราถูกระบุไว้เป็นคำกลอนหรือเขียนเป็นปริศนา เพื่อใช้ถ่ายทอดให้เพียงลูกศิษย์เท่านั้น ดังตำรับยาอายุวัฒนะที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นตำรับยาถูกบอกเล่ากันมาอย่างช้านาน รายละเอียดจาก ตำรายาพิเศษ ของ พระเจ้าบรมวงศ์เธอ กรมสมเด็จพระปวงเรศวริยาลงกรณ์ (สมเด็จพระเจ้าบรมวงศ์เธอ กรมพระยาปวเรศวริยาลงกรณ์, 2464) โดยถูกระบุไว้ดังนี้

“... ภิกษุหนุ่มเล่า อายุห้าพเจ้า ได้เกิดแต่ใน แผ่นดินนารายณ์ บิดาว่าไว้ อายุห้าได้ ครบถ้วน สามสิบปี ใหญ่แล้วบวชมา จนกาลบัดนี้ ก็รอบที่ปี ข้ามิได้จำ ฯ ...”

“... พระหนุ่มเล่าว่า ข้าได้กินยา แต่หนุ่มจ๊กสอน เครื่องยาหกลิ่ง เจื่อแซกของร้อน ทำผงปั้นก้อน เท่าเม็คพุทรา เมื่อกินนั้น ไข้ อายุเพียงใด ร่างกายกายา คงอยู่เพียงนั้น ห้ามกินชรา กำลังเจริญกล้า เดินคล่องว่องไว ทิ้งถ่อนตะโกนา สองสิ่งจงหา เปลือกมาเตรียมไว้ บรรเพ็ช หัวหมู หากได้ เมล็ดข่อยพริกไทย หกลิ่งเสมอกัน ทำเป็นผงแล้ว นำผึ้งละลายจั้น วันหนึ่งผงปั้น เท่าเม็คพุทรา อย่าให้ใหญ่นัก จักเผากายา ให้ผอมผิดตา เพราะยาเผาเลน ๆ ...”

“...พระหนุ่มมองคั้นั้น ตามเขาเล่ากันว่า เป็นเจ้าของยา คำนวณอายุ ตั้งแต่เกิดมา หักเป็นพรรษา ร้อยเจ็ดสิบเจ็ดปี คิดเป็นอายุ แต่ได้เกิดมี ร้อยเก้าสิบเจ็ดปี ในที่ศกแสดง ๆ ...”

ตำรับยาอายุวัฒนะที่กล่าวถึง ประกอบด้วยเครื่องยาทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ เปลือกทั้งถ่อน เปลือกตะโกนา เถาบระเพ็ด หัวแห้วหมู เมล็ดข่อย และเมล็ดพริกไทย บดเป็นผงสิ่งละเท่าๆ กัน ผสมน้ำผึ้งรับประทาน หรือปั้นเป็นลูกกลอน รับประทานวันละ 1 ครั้ง

ในปี 2565 มีการศึกษาทางคลินิก ถึงผลของตำรับยาอายุวัฒนะต่อคุณภาพการนอนในผู้สูงอายุที่มีภาวะนอนไม่หลับ โดยกลุ่มตัวอย่างได้รับแคลเซียมธาตุอายุวัฒนะปริมาณ 600 มิลลิกรัม/วัน ติดต่อกัน 4 สัปดาห์ ผลพบว่า ค่าเฉลี่ยของคุณภาพการนอนหลับในผู้สูงอายุที่มีภาวะนอนไม่หลับดีกว่าก่อนทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($t = 21.55, p < .05$) และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รศริน ใจเย็น, 2565)

อย่างไรก็ตาม ในช่วงปี 2545- 2562 มีการศึกษาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตำรับยาอายุวัฒนะในหลอดทดลอง สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตำรับยาอายุวัฒนะ

ปี	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
2545	ฤทธิ์กำจัดสารอนุมูลอิสระ	วิธีสกัด: น้ำ, 95% Ethanol, สารสกัดด้วยน้ำหลังจากสกัดด้วย 95% Ethanol	- สารสกัดด้วยน้ำแสดงฤทธิ์ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระดีกว่าสารที่สกัดด้วย 95% Ethanol ยกเว้นเปลือกต้นตะโกนา - สารสกัดด้วยน้ำของเปลือกต้นทั้งก่อนมีประสิทธิภาพดีที่สุด $EC_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$ - สารสกัดด้วยน้ำของตำรับยารวมมีค่า $EC_{50} = 6.21 \mu\text{g/ml}$ - สารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า $EC_{50} = 7.05 \mu\text{g/ml}$	(โชติกา เกิดสิน, ศิวพร ปิเจริญทรัพย์, & ชมาพร คงทอง, 2545)
2551	ฤทธิ์ยับยั้ง β -Hexosaminidase	วิธีสกัด: 95% Ethanol, น้ำ วิธีการศึกษา: การปล่อย β -hexosaminidase จาก RBL-2H3 cells	- สารสกัดพริกไทยมีฤทธิ์ต้านการแพ้มากที่สุด ค่า $IC_{50} = 14.0 \mu\text{g/ml}$ ดีกว่า ketotifen fumarate ที่เป็น positive control ($IC_{50} = 20.2 \mu\text{g/ml}$) - สารสกัดผสมพริกไทยและตะโกนา อัตราส่วน 1:1 และสารสกัดพริกไทยและบอระเพ็ด ในอัตราส่วน 1:1 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง antigen-induced degranulation in RBL-2H3 cells มีค่า $IC_{50} = 23.5$ และ $26.7 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และมีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดสูตรตำรับเดิม ($IC_{50} = 66.6 \mu\text{g/ml}$)	(Kraithep, Oungbho, & Tewtrakul, 2008)
2551	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น	วิธีสกัด: 95% Ethanol	- สารสกัดจากเปลือกทั้งก่อนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นมากที่สุด ($IC_{50} = 44.34 \mu\text{g/ml}$) รองลงมาคือ สารสกัดรวมของตำรับ	(สิริเพ็ญ เดือนฉาย & สิริรัตน์ เต็มจุก, 2551)
		วิธีการศึกษา: DPPH method	อายุวัฒนะ ($IC_{50} = 187.62 \mu\text{g/ml}$)	

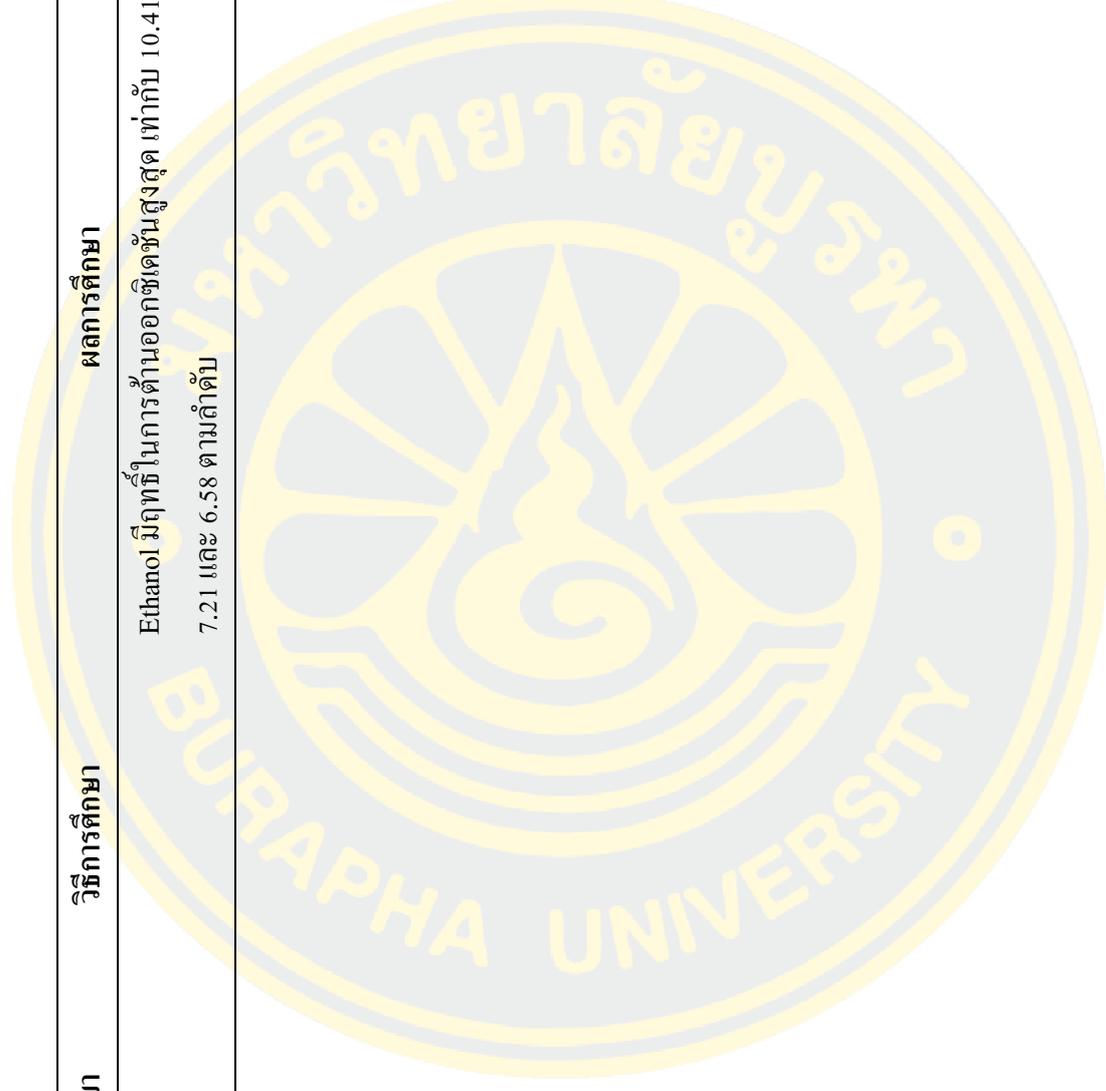
ปี	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
	ฤทธิ์ยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง	วิธีการศึกษา: AAPH hemolysis method ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละชนิดเท่ากับ 5 mg/ml	<ul style="list-style-type: none"> - กลุ่มควบคุมใช้เวลา 50% hemolysis 78 นาที - สารสกัดเปลือกทั้งก่อนสามารถยัดเวลาของ 50% hemolysis ได้มากที่สุด (157 นาที) รองลงมา คือ สารสกัดรวมของตำรับอายุวัฒนะ (142 นาที), หัวหมู (126 นาที), เปลือกตะโกนา (114 นาที), พริกไทย (108 นาที), บอระเพ็ด (101 นาที) และเมล็ดข่อย (100 นาที) ตามลำดับ - ค่าของวิตามินอี (0.5 mg/ml) เท่ากับ 160 นาที 	
	ตรวจสอบทางพิษเคมีเบื้องต้น	วิธีการศึกษา: Shinoda test และ Ammonia test	<ul style="list-style-type: none"> - สารสกัดรวมของตำรับอายุวัฒนะ ทั้งอ่อนและแก่หาหมีสารกลุ่ม Phenolic compound, Tannin และ Flavonoids - สารสกัดจากพริกไทย ตะโกนา และข่อย มีสารกลุ่ม Phenolic compounds และ Flavonoids - สารสกัดจากบอระเพ็ดมีสารกลุ่ม Phenolic compounds 	

ปี	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
2555	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	วิธีสกัด: เอทานอล วิธีการศึกษา: DPPH method	สารสกัดจากเปลือกทั้งก่อนมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงที่สุด ($SC_{50} = 2.9 \mu\text{g/ml}$) ส่วนสารสกัดสมุนไพรชนิดอื่น มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี โดยให้ค่า SC_{50} ในช่วงระหว่าง 9.7-49.3 $\mu\text{g/ml}$ ยกเว้นสารสกัดจากเมล็ดข่อย ($SC_{50} > 120 \mu\text{g/ml}$)	(ยุทธนา พงษ์พิริยะ เศษ, พัชรินทร์ นวด ศรีทอง, & นฤมล ศิริ นทราเวช, 2555)
	การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส	วิธีการศึกษา: การทำปฏิกิริยาค่ายแซนทีน (xanthine)	สารสกัดจากหัวหญ้าแห้วหมูและเปลือกทั้งก่อน มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ดี โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 45.1 และ 49.4 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากสมุนไพรอื่นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้น้อย โดยให้ค่า $IC_{50} \geq 90.5 \mu\text{g/ml}$	
2557	ฤทธิ์ต้านออกซิชั่น	วิธีสกัด: น้ำ วิธีการศึกษา: DPPH และ FRAP assay	- ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในการทดสอบทั้ง 2 วิธี ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) - ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันน้อยกว่าสารมาตรฐาน Ascorbic acid	(กรกนก โอภาส ตระกูล, ชวิกานต์ ทับบุญ, พรรณวดี อุปนันท์, เมธิน ผดุงกิต, & พรพรรณ เหล่าวัชรเสาวรรณ, 2557)
2557	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	วิธีการเตรียม: บดเป็นผงผสมน้ำผึ้ง ป็นเป็นลูกกลอน สกัด	- ตำรับยาความเข้มข้น 10,000 $\mu\text{g/ml}$ ประกอบด้วย ทั้งก่อนและหลังบด	(วิรัตน์ โสทรส et al., 2557)

ปี	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
		ด้วย 40% เอทานอล	ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ เท่ากับ 67.35% - คาร์บอซิลที่มีความสามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระ มีค่า SC_{50} = 35.20 mg/ml	
		วิธีการศึกษา: DPPH radical scavenging activity	- สารมาตรฐาน Vitamin C มีค่า SC_{50} = 0.00418 mg/ml และวิตามินอี มีค่า SC_{50} = 0.0053 mg/ml - ปริมาณสาร Flavonoid ของตำรับยา = 8.93 mg/g ของสารสกัด มีปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับตำรับอื่นที่ทดสอบ	
2557	ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ J774A.1	วิธีสกัด: น้ำ วิธีการศึกษา: กระตุ้นเซลล์ด้วยวิธี Griess reaction หลังเซลล์ได้รับสารสกัดนาน 24 ชม.	- สารสกัดน้ำของหัวแม่มือและเมล็ดพริกไทยที่ 3.13, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกในระดับ mRNA ของ IL-1 β , IL-6, TNF- α และ iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจ ตามความเข้มข้นของสารสกัด - สารสกัดน้ำจากเมล็ดข่อย เถาบระเพ็ด และเปลือกตะโกนาที่ 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กระตุ้นต่ำกว่าสารสกัดข้างต้น - สารสกัดจากเปลือกทั้งก่อนไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้าง NO - สารสกัดทุกตัวในความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ	(กุดนันทน์ จงนิมิต ไพบุลย์, 2557)
	ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อ	วิธีการศึกษา: กระตุ้นเซลล์	- สารสกัดจากตำรับและสารสกัดจากสมุนไพรเพิ่มการ	

ปี	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
	การแสดงออกในระดับ mRNA ของโปรตีน	ด้วยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์ หลังเซลล์ที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 4 และ 24 ชม.	แสดงออก ในระดับ mRNA ของ IL-1 β , IL-6, TNF- α และ iNOS ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ของเซลล์โครฟาที่ถูกกระตุ้นชนิด M1 - กระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 และ Argenase-1 ที่เป็นตัวบ่งชี้ของเซลล์แมคโครฟาที่ถูกกระตุ้นชนิด M2 - สารสกัดจากเปลือกทังถ่อน ไม่มีผลต่อการแสดงออกของตัวบ่งชี้ของเซลล์แมคโครฟาที่ถูกกระตุ้น - สารสกัดจากตำรับและหัวเห็ดหมีมีความแรงในการกระตุ้นแมคโครฟาสูงสุด ตามด้วยสารสกัดจากเมล็ดพิริกไทย - สารสกัดเมล็ดข่อย ภูเขาชะเอม และเปลือกตะโกนามีฤทธิ์ต่ำกว่า สารสกัดข้างต้น	
2562	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	วิธีการสกัด: นำเอทานอลเอทิลอะซิเตท และเฮกเซน วิธีการศึกษา: ABTS cation scavenging assay	- การสกัดสารด้วยเอทานอลมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันโดยรวมสูงสุด เท่ากับ 7.73 มิลลิกรัมสมมูลของวิตามินอีต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง - สารสกัดข่อย, ทังถ่อน และ เห็ดหมี ที่สกัดด้วย Ethyl acetate มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงสุด เท่ากับ 6.73, 54.15 และ 4.82 ตามลำดับ - สารสกัดตะโกนา, บอระเพ็ด และพิริกไทยดำ สกัดด้วย	(รัตติยา ตังบุญเกียรติ, 2562)

ปี	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
			Ethanol มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงสุด เท่ากับ 10.41, 7.21 และ 6.58 ตามลำดับ	



สมุนไพรในตำรับยาอายุวัฒนะ

ทิงถ่อน (Ting-thon)



ภาพที่ 2 เปลือกต้นทิงถ่อน

ลักษณะของเครื่องยา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Albizia procera* (Roxb.) Benth.

ชื่อวงศ์ : Fabaceae

ชื่อสามัญ : White siris

ส่วนที่ใช้ : เปลือกต้น

ลักษณะทั่วไปของเครื่องยา : เปลือกต้นสีเทาแกมน้ำตาล

สรรพคุณตามตำรับยาไทย : เปลือกต้น รสฝาดร้อน แก้ลมในกองธาตุ แก้หืดไอ แก้

ท้องร่วง แก้อาเจียน เจริญอาหาร เป็นยาอายุวัฒนะ

องค์ประกอบทางเคมี

เปลือกต้น มีสารกลุ่ม triterpenoids, saponins, sapogenin, diterpenoids lignans, pyridine glycosides, phenols and flavonoids เช่น 3-O-Methyl-dglucose [55.38 %], 13-Tetradec-11-yn-1-ol [10.00 %], Benzo [b]thiophene-2 carboxamide, 3-chloro-N-(4-methoxyphenyl) [8.97%], Squalene [6.15%], 6,9,12 Octadecatrienoic acid, phenylmethylester, (Z,Z,Z) [4.87%], 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, phenylmethyl ester [3.85%], Phytol [3.33%], 1,10-Decanediol [2.31%] เป็นต้น (Sivakrishnan & Kavitha, 2018)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของทิงถ่อนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด MCI

เปลือกต้น มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบ โดยลดระดับของ TNF- α , IFN- α , IL-2, IL-6 and myeloperoxidase และ สามารถเพิ่มระดับ cathepsin D levels ในเลือด (Sangeetha, Chamundeeswari, Saravana Babu, Rose, & Gopal, 2020) ฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย

สามารถเรียกคืนระดับของ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), reduced glutathione (GSH) และสามารถลด lipid peroxidation (LPO) ในเลือด (Sangeetha et al., 2020) ฤทธิ์ในการดักจับ free radical (Sivakrishnan & Muthu, 2013) (Sivakrishnan & Kottaimuthu, 2013) (Sivakrishnan, Kavitha, & Muthu, 2013) ฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตาย โดยส่งผลกระทบต่อการทำงานของ caspases-9, -8, and -3 ใน cells (J. Zhang et al., 2018)

ตะโกนา (Tako-na)



ภาพที่ 3 เปลือกต้นตะโกนา

ลักษณะของเครื่องยา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Diospyros rhodocalyx* Kurz

ชื่อวงศ์ : Ebenaceae

ชื่อสามัญ : Ebony

ส่วนที่ใช้ : เปลือกต้น

ลักษณะทั่วไปของเครื่องยา : ไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลำต้นตรงเปลือกสีดำ

แตกเป็นสะเก็ดหนาๆ เรือนยอดเป็นพุ่มกลมหรือรูปไข่ ทึบ กิ่งอ่อนมีขนประปรายปลายกิ่งมักห้อยลู่ลง ใบเดี่ยว เรียงสลับ ทรงใบ รูปไข่ป้อม และรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปุน โคนใบสอบเป็นรูปลิ้น ปลายใบมน ป้าน หรือหยักเว้าเข้า เนื้อใบค่อนข้างหนา ขอบใบเรียบ ดอกแยกเพศ ดอกตัวผู้เป็นช่อ กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นรูปคนโทหรือรูปไข่ สีขาวนวล ดอกตัวเมียเป็นดอกเดี่ยว ลักษณะคล้าย ดอกตัวผู้ แต่ขนาดใหญ่กว่า ผลสด รูปไข่ มีขนละเอียดและกลีบเลี้ยงยังคงติดอยู่

สรรพคุณตามตำรับยาไทย : เปลือกต้น บำรุงธาตุ บำรุงกำลัง รักษาโรคกามตายด้าน เป็นยาอายุวัฒนะ ขับระดูขาว หรือต้มกับเกลือ อมรักษารามะนาด (อาการเห็งือกบวม ปวด) แก้ปวดฟัน ผสมกับเปลือกทังถ่อน หัวเห้วหมู เมล็ดข่อย ผลพริกไทยแห้ง และเถาอบระเพ็ดอย่างละเท่ากัน คองเหล้าหรือต้มน้ำดื่ม เป็นยาอายุวัฒนะ

องค์ประกอบทางเคมี

ตะโกนา มีสารกลุ่ม triterpenoids and naphthoquinones (Mallavadhani, Panda, & Rao, 1998) เนื้อไม้ มีสาร Lupeol, β -sitosterol, stigmasterol, diospyrin, betulinaldehyde, (Theerachayan, Sirithunyalug, & Piyamongkol, 2007) betulin, betulinic acid, taraxerone, lupenone (Othong R, Trakulsrichai S, Wananukul W., 2017)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตะโกนาที่เกี่ยวข้องกับการเกิด MCI

เปลือกต้น ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (สุพัตรา ชวลิตพงษ์, จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์, รัตนา ปานเรียนแสน, & เชิดชีวิตศาสตร์, 2557)

ฤทธิ์ยับยั้งการปล่อยเอนไซม์ β -hexosaminidase (Kraithep et al., 2008)

บอระเพ็ด (Bora-phet)



ภาพที่ 4 เถาอบระเพ็ด

ลักษณะของเครื่องยา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson

ชื่อวงศ์ : Menispermaceae

ชื่อสามัญ : Guduchi

ส่วนที่ใช้ : เถาที่โตเต็มที่

ลักษณะทั่วไปของเครื่องยา : เถาเลื้อย มีเนื้อแข็ง ไม่มีขน ยาวได้ถึง 15 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 เซนติเมตร เปลือกเถาหนา 1.5-2.5 มิลลิเมตร ผิวนอกสีน้ำตาล เนื้อในสีเทาแกมเหลือง เถากลม ผิวเถาขรุขระไม่เรียบ เป็นปุ่มกระจายทั่วไป เมื่อแก่เห็นปุ่มปมเหล่านี้หนาแน่น และชัดเจนมาก เปลือกเถาคายเชื้อกระดาษ มียางขาว ใส เปลือกบางลอกออกได้ บางตอนของเถาพบรากอากาศคล้ายเส้นด้าย กลมยาว สีน้ำตาลเข้ม เมื่อตัดเถาตามขวางพบแนวเส้นเป็นรัศมีออกจากจุดศูนย์กลาง ประมาณ 15-20 เส้น ระหว่างเส้นเป็นรูพรุน เถามีมีกลิ่นเฉพาะ รสขมจัดเย็น

สรรพคุณตามตำรับยาไทย : เถา มีรสขมจัดเย็น แก้ไข้ทุกชนิด แก้พิษฝีดาษ เป็นยาขมเจริญอาหาร ต้มดื่มเพื่อให้เจริญอาหาร ช่วยย่อย บำรุงน้ำดี บำรุงไฟธาตุ แก้โรคกระเพาะอาหาร บำรุงร่างกาย แก้สะอึก แก้มาลาเรีย เป็นยาขับเหงื่อ ขับกระหาย แก้ร้อนในดีมาก ลดน้ำตาลในเลือด ระวังความร้อน ทำให้เนื้อเย็น ทำให้เลือดเย็น แก้โลหิตพิการ

องค์ประกอบทางเคมี

เถา มีสารกลุ่ม flavone, flavone glycosides, triterpene, diterpene, diterpene glucoside, *cis-clerodane* (type of furanoditerpenoids), alkaloid, lignan, sterol และ saponins เช่น Quaternary, Apigenin, vanillin, syringin, magnoflorine, Borapetoside A-G (Waqas Ahmad, Jantan, & Bukhari, 2016; Koay & Koay, 2013) (Abood, Fahmi, Abdulla, & Ismail, 2014)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบอระเพ็ดที่เกี่ยวข้องกับ MCI

เถา มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน โดยเพิ่มการทำงานของระบบ (Abood et al., 2014) (Paroindrana, 2012) (Cavin, Hostettmann, Dyatmyko, & Potterat, 1998) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยยับยั้งระดับของ NO และ iNOS (Abood et al., 2014) ฤทธิ์ยับยั้ง Acetylcholinesterase (AChE) (Ingkaninun, Panriansaen, & Cherdshewasart, 2010; Yusoff, Hamid, & Houghton, 2014) ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด เพิ่มปริมาณความเข้มข้นของไลโปโปรตีน (HDL) และซีรัมอินซูลินให้สูงขึ้น (Poonsawat, Baydoun, Chomko, & Talubmook) ฤทธิ์ต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน กระตุ้นการแบ่งตัวของ T- and B-lymphocytes เพิ่มความเข้มข้นของ Th1 (TNF- α , IL-2, and IFN- γ) and Th2 (IL-4) cytokines ในเซรัม (W. Ahmad, Jantan, Kumolosasi, & Bukhari, 2015) ฤทธิ์ต้านการแบ่งตัว และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

หญ้าแห้วหมู (Ya-haeo-mu)



ภาพที่ 5 หญ้าแห้วหมู

ลักษณะของเครื่องยา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Cyperus rotundus* L.

ชื่อวงศ์ : Cyperaceae

ชื่อสามัญ : Nut grass

ส่วนที่ใช้ : หัวใต้ดิน

ลักษณะทั่วไปของเครื่องยา : เป็นลำต้นใต้ดินรูปกระสวย แข็งเห็นเป็นข้อๆ ผิวไม่เรียบ มีความเหนียว ยาว 1.5-3 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 เซนติเมตร ผิวนอกสีเทาน้ำตาลถึงสีเทาดำ มี 5-8 ข้อ แต่ละข้อมีขนราก เนื้อภายในสีเหลืองถึงน้ำตาลแดง มีกลิ่นหอมเฉพาะ รสเผ็ดปร่าและขม

สรรพคุณตามตำรายาไทย : หัวใต้ดิน ขับลมในลำไส้ แก้ปวดท้อง แก้ปวดประจำเดือน แก้ประจำเดือนผิดปกติ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องอืดเพื่อ บำรุงกำลัง บำรุงครรภ์ รักษา (บำรุงทารกในครรภ์) เป็นยาบำรุงหัวใจ ขับเหงื่อ ขับระดู ขับปัสสาวะ แก้ไข้ เป็นยาฝาดสมาน สงบประสาท เป็นยาอายุวัฒนะ แก้ไข้ ลดความดัน โลหิต ลดการอักเสบ แก้บิด แก้ท้องเสีย แก้อาเจียน แก้โรคตับอักเสบ

องค์ประกอบทางเคมี

หัวใต้ดิน มีสารกลุ่ม alkaloids, flavonoids, glycosides, phenols, tannins, steroids, starch and many novel sesquiterpenoids, mono- and sesquiterpenes ได้แก่ pinene, cineol, calamene, delta-cadinene, β -cadinene, alloaromadendrene, α -cubebene, α -cyperene, cyperol, cyperolone, cyperotundone (Kamala, Middha, & Karigar, 2018; Meena et al., 2010; ธเนศ ปรางโท, 2546)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเห็ดหมูที่เกี่ยวข้องกับ MCI

หัวใจไตคน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยกำจัด superoxide anion radical (Tran et al., 2014) ปกป้อง DNA จาก H_2O_2 (Jahan & ALI, 2012; K. H. Kumar & Khanum, 2013) และยับยั้งปฏิกิริยาในกระบวนการเริ่มต้นของ oxidation reaction (D. Pal & Dutta, 2006) รวมถึงควบคุมการทำงานของเอนไซม์และระดับโปรตีนที่แสดงออกของ antioxidant เช่น SOD, CAT, GPx, GR, HSP-70, Caspase-3, และ Bcl-2 นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของ Brain derived nerve growth factor (BDNF) (K. H. Kumar & Khanum, 2013)

ฤทธิ์ป้องกันการอักเสบ ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด paw edema ด้วย carrageenan (Chithran, Ramesh Babu, & Himaja, 2012) ฤทธิ์ป้องกันการแตกหักของ DNA ส่งผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis (Kilani, et al., 2008) ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด โดยมีผลต่อ collagen, thrombin และ arachidonic acid (Seo et al., 2011)

ฤทธิ์ในการปกป้องการตายของเซลล์ประสาท โดยซ่อมแซมระดับเอนไซม์ SOD และ CAT ที่เหนี่ยวนำด้วย SIN-1 ทำให้เกิดการสร้าง nitric oxide และ protein nitration (Hemanth Kumar, Tamatam, Pal, & Khanum, 2013) ฤทธิ์ยับยั้งผลของ $Na^+ K^+$ ATPase activity ในสมองหนูทดลอง (Ngamrojanavanich, Manakit, Pornpakakul, & Petsom, 2006) ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ acetylcholine esterase และมีผลต่อการคลายกล้ามเนื้อ (Jahan & ALI, 2012)

ข่อย (Khoi)



ภาพที่ 6 เมล็ดข่อย

ลักษณะของเครื่องยา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Streblus asper* Lour.

ชื่อวงศ์ : Moraceae

ชื่อสามัญ : Tooth brush tree หรือ Siamese rough bush

ส่วนที่ใช้ : เมล็ด

ลักษณะทั่วไปของเครื่องยา : ผล รูปกลม หรือรูปไข่ ขนาดประมาณ 0.8 เซนติเมตร มีเมล็ดเดี่ยว ผลแก่สีเหลืองหรือส้ม นํ้าเนื้อเมื่อแรกรวมอยู่กับวงกลีบรวมที่ใหญ่ขึ้น ยาว 5-8 มิลลิเมตร ต่อไปเมื่อแก่จะ โผล่จากวงกลีบรวม และวงกลีบรวมจะงอพับ มีกลีบเลี้ยงสีเขียวหุ้ม ปลายผลมีก้านเกสรตัวเมียคล้ายเส้นด้ายติดอยู่ ก้านผลยาว 7-27 มิลลิเมตร เมล็ดกลม กว้าง 4-5 มิลลิเมตร สีขาวแกมเทา

สรรพคุณตามตำรับยาไทย : เมล็ด รสเมาหวานร้อน บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ โลหิตและลม แก้กระษัย ขับลมจุกเสียด เป็นยาอายุวัฒนะ ผสมกับหัวเห็ดห่ม เปลือกทิ้งถ่อน เปลือกตะโกนา ผลพริกไทยแห้ง และเถาอบระเพ็ด ดองเหล้าหรือต้มนํ้าดื่ม เป็นยาอายุวัฒนะ

องค์ประกอบทางเคมี

เปลือกต้น มีสารกลุ่ม cardiac glycosides จำนวนมาก เช่น asperoside, strebloside, kamloside, mansinin, indroside, cannodimemoside, strophalloside, strophanolloside, 16-O-acetylglucogitomethoside, glucogitodimethoside, glucokamloside, sarmethoside และ glucostrebloside เป็นต้น

ใบ มีสารกลุ่ม triterpenoid saponin และ polyphenolic compounds ได้แก่ gallic acid, isoquercetin, quercetin, rutin, catechin และ tannic acid และ กลุ่มน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ phytol (45.1%), a-farnesene (6.4%), trans-farnesyl acetate (5.8%), caryophyllene (4.9%) and trans-trans-a-farnesene (2.0%). สารกลุ่มอื่น เช่น α -copaene, β -elemene, caryophyllene, geranyl acetone, germacrene, d-cadinene, caryophyllene oxide and 8-heptadecene. (Rastogi, Kulshreshtha, & Rawat, 2006)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของข่อยที่เกี่ยวข้องกับการเกิด MCI

เปลือกต้น มีฤทธิ์เพิ่มระดับ glutathione (GSH) และ catalase (CAT) และ Superoxide dismutase (SOD) ลดระดับการเกิดออกซิเดชันของไขมัน Lipid peroxidation (R. S. Kumar et al., 2015)

ใบ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase (COX)-2 และ Inducible nitric oxide synthase (iNOS) ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ ด้วยสาร

lipopolysaccharides (LPS) (Sripanidkulchai, Junlatat, Wara-aswapati, & Hormdee, 2009) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็นตัวจับสารอนุมูลอิสระ (Singsai, Akaravichien, Kukongviriyapan, & Sattayasai, 2015) ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) และด้านการเรียนรู้และความจำบกพร่องในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสาร scopolamine (Rakwarinn Wannasin, Jintana Sattayasai, Prapawadee puapairoj, & Tarinee Arkaravichien, 2010)

พริกไทย (Phrik-thai)



ภาพที่ 7 เมล็ดพริกไทยดำ

ลักษณะของเครื่องยา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Piper nigrum* L.

ชื่อวงศ์ : Piperaceae

ชื่อสามัญ : Pepper

ส่วนที่ใช้ : ผลแห้งแก่จัดแต่ยังไม่สุกทั้งเปลือก

ลักษณะทั่วไปของเครื่องยา : ผลแห้งมีผิวสีดำ ผิวนอกหยาบ มีรอยย่น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางราว 4-6 มม. เปลือกนอกสีน้ำตาลเข้มออกดำ มีรอยย่นคล้ายร่างแห ที่ขั้วมีรอยก้านผล เปลือกผลชั้นนอกและชั้นกลางลอกออกง่าย เปลือกชั้นในบางและค่อนข้างแข็ง 1 ผลมี 1 เมล็ด พริกไทยดำมีสีน้ำตาล-ดำ กลิ่นฉุน รสเผ็ดเล็กน้อย ทางยานิยมใช้พริกไทยดำมากกว่าพริกไทยอ่อน

สรรพคุณตามตำรายาไทย : เมล็ด ลดอาการท้องอืดเพื่อ แน่นจุกเสียด ขับลมในลำไส้ให้ผายเรอ ช่วยเจริญอาหาร, แก้กองลม, บำรุงธาตุ, แก้ลมอัมพฤกษ์, แก้ลมตกิต, แก้ลมสกัดกะวาดะ, แก้ลมอันเนื่องจากอวัยวะสืบพันธุ์, แก้ลมมุตตมาต (ลมที่ทำให้ท้องล้น โครกคราก) ขับเสมหะ ขับเหงื่อ ช่วยลดอุณหภูมิในร่างกาย ทำให้ตัวเย็นรู้สึกร้อนเหงื่อออกสบาย ขับปัสสาวะ กระตุ้นประสาท บำรุงธาตุ บำรุงไฟธาตุ แก้อาหารไม่ย่อย ผลและเมล็ด รักษาอาการปวดกระเพาะอาหาร อาเจียน แก้ลม จุกเสียด แน่นท้อง ขับลมในกระเพาะ ท้องเสีย แก้ปวดท้อง ปวดฟัน แก้

ท้องอืด อาหารไม่ย่อย แก้วหวัด ทำให้น้ำลายออกมาก ช่วยให้น้ำย่อยหลังมากขึ้น ทำให้อุณหภูมิของอาหาร
 แก่ก่อนเพื่อย่อยง่ายขึ้น แก้วบิวด ปวดเมื่อยตามร่างกาย ตะคริว แผลปวดเพราะสุนัขกัด ฟี่ สะอึก
 ห้ามเลือด ยาหลังคลอดบุตร ปวดศีรษะ แก้วอาหารเป็นพิษ

องค์ประกอบทางเคมี

เมล็ดพริกไทยดำ มีอัลคาลอยด์ ได้แก่ piperine, piperettine เป็นองค์ประกอบหลัก
 chavicine, piperylene, piperoleines A-C, piperanine น้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม
 monoterpenes และ sesquiterpenes ประกอบด้วย beta-caryophyllene, delta-3-carene, limonene,
 beta-pinene, alpha-pinene, terpinolene, alpha-copaene, alpha-humulene, delta-cadinene, camphene
 เป็นต้น (Dosoky et al., 2019; อรพิน เกิดชูชื่น, ญัฐฐา เลหากุลจิตต์, & ชนະภักย์, 2553; อารยา ข้อคำ,
 2560)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพริกไทยที่เกี่ยวข้องกับ MCI

เมล็ด มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยยับยั้งการสร้างสารสื่อกลาง (pro-inflammatory mediators)
 ได้แก่ interleukin-6 (IL-6) และ prostaglandin E2 (PGE₂) ฤทธิ์โดยตรงต่อการยับยั้งรีเซพเตอร์ของ
 เอนไซม์ cyclooxygenase-2 ทำให้ PGE₂ ถูกสร้างลดลง รวมถึงลดกระบวนการสร้างสารที่ทำให้เกิด
 การอักเสบจากการใช้ arachidonic acid (Tangyuenyongwatana & Gritsanapan, 2014; Tasleem,
 Azhar, Ali, Perveen, & Mahmood, 2014) ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) (อินทัช สักดิ์
 กักดีเจริญ, สุนิตา มากชูชิต, & อรุณพร อิฐรัตน์, 2557) ฤทธิ์ต้านอาการชัก โดยออกฤทธิ์ผ่าน
 GABA-ergic pathways (Bukhari, Alhumayyd, Mahesar, & Gilani, 2013) ฤทธิ์เพิ่มพฤติกรรมกรมการ
 เรียนรู้และความจำในหนูทดลอง และเพิ่มระดับของตัวรับนิโคตินิกอะเซทิลโคลีนในสมองของหนู
 (Chaiwiang, Pongpattanawut, Khorana, Thanoi, & Teaktong, 2016) ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ
 AChE (Ingkaninan, Temkitthawon, Chuenchom, Yuyaem, & Thongnoi, 2003)

จากการค้นคว้าส่วนประกอบของตำรับยาอายุวัฒนะ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเครื่องยาทั้ง 6
 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับกลไกของ MCI มีความเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ เช่น กระบวนการอักเสบ
 การต้านการเกิดออกซิเดชัน กระบวนการตายของเซลล์ สารสื่อประสาท การกระตุ้นภูมิ เป็นต้น
 สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะที่เกี่ยวข้องกับการเกิด MCI

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	ทั้งอ่อน	ตะโกนา	บอระเพ็ด	แห้วหมู	ข่อย	พริกไทย
ต้านการอักเสบ	- ลดระดับ TNF- α , IFN- α , IL-2, IL-6 และ myeloperoxidase - เพิ่มระดับ cathepsin D	-	- ยับยั้งระดับ NO และ iNOS	- เพิ่มการแสดงออกของ BDNF	- ยับยั้ง COX-2, iNOS และ PGE ₂ - ยับยั้งไซโตไคน์ของ COX-2	- ยับยั้งการสร้าง IL-6 - ลดการสร้างสารจาก การใช้ arachidonic acid (AA) - ยับยั้งการสร้าง NO
เหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย	- ยับยั้งการแบ่งตัว			เหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย	- ยับยั้งการแบ่งตัว	
ต้านการเกิดออกซิเดชัน	- ศึกษาค้นระดับของ SOD, GPX - ลด GSH, LPO - ดักจับ free radical	-	- เพิ่มการทำงานของระบบต้านออกซิเดชัน	- กำจัด O ₂ ⁻ - ยับยั้งปฏิกิริยาในกระบวนการเริ่มต้นของการเกิดออกซิเดชัน - ควบคุมการทำงานของเอนไซม์และระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดออกซิเดชัน	- เพิ่มระดับ GSH, CAT, SOD - ลดระดับการเกิด LPO - ดักจับ free radical	-

จุดชี้ทาง เภสัชวิทยา	ทั้งก่อน ตะโกนา	บอระเพ็ด	แก้หยา	ข่อย	พริกไทย
			- ช่อมแซมระดับ เอนไซม์ SOD และ CAT		
กระตุ้นภูมิคุ้มกัน	-	- กระตุ้นการแบ่งตัว ของ T- B-lymphocytes - เพิ่มความเข้มข้นของ TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-4	-	-	-
ต้านอาการชัก	-	-	-	-	ออกฤทธิ์ผ่าน GABAergic pathways

การบ่งชี้เครื่องยาด้วยวิธีการโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง

วิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography) หรือ วิธี TLC เป็นวิธีการแยกสารที่สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว ให้ผลที่น่าเชื่อถือ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การพิสูจน์ชนิดเครื่องยา การหาปริมาณสารสำคัญ การตรวจสอบการปนเปื้อนหรือปนปลอม การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ การสกัดแยกสารสำคัญ โดยอาศัยกลไกในการแยกแบบ partition และ absorption ของวัฏภาค 2 ส่วน ได้แก่ วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) เป็นสารผสมของตัวทำละลายที่เคลือบบนวัสดุรองรับ และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่า

วิธี TLC สามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่าหรือภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่นสั้น (254 nm) และความยาวคลื่นยาว (365 nm) และตรวจสอบด้วยน้ำยาพ่นชนิดต่างๆ (Spraying reagents) ประเมินผลด้วยการเปรียบเทียบกับตัวอย่างเครื่องยาที่ถูกต้อง (Authentic sample) หรือสารเปรียบเทียบกับ (Reference substances) โดยพิจารณาเอกลักษณ์ของโครมาโทแกรม (Pattern) สี ตำแหน่งของแถบสารแต่ละแถบ บันทึกเป็นค่า R_f ซึ่งเป็นค่าของระยะทางที่แถบสารเคลื่อนที่ไปต่อระยะทางของวัฏภาคเคลื่อนที่

ชนิดของน้ำยาพ่น

- 10% KOH ใช้ตรวจสอบสารกลุ่ม anthraquinones ผลบวกจะให้สีแดงเมื่อตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติ
- Anisaldehyde/sulfuric acid ใช้ตรวจสอบสารกลุ่ม steroids, prostaglandins, carbohydrates, phenols, glycosides, saponins, น้ำมันหอมระเหย ผลบวกจะได้สีม่วงแดง สีแดงอิฐ สีน้ำเงิน เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติ และเรืองแสงต่างๆ เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 365 nm
- Natural product ใช้ตรวจสอบสารกลุ่ม flavonoid, carbohydrates, anthocyanidins, hydroxyl- และ methoxycinnamic acid ผลบวกจะให้การเรืองแสงสีต่างๆ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 365 nm
- Dragendorff's ใช้ตรวจสอบสารกลุ่ม alkaloids ผลบวกจะให้สารสีส้ม เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติ
- Phosphomolybdic acid ใช้ตรวจสอบสารกลุ่ม lipids, steroids, lactones, ketoacids, hydroxy acid, unsaturated fatty acid และสารกลุ่ม phenolic ผลบวกจะให้สีเทา-ดำ เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติ

การตรวจสอบเครื่องยาในตำรับยาที่มีส่วนประกอบใกล้เคียงกับตำรับยาอายุวัฒนะ ด้วยวิธี TLC สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการตรวจสอบเครื่องยาและตำรับยาด้วยวิธี TLC ในตำรับยา

เครื่องยา/ตำรับยา	กลุ่มสารสำคัญ	ภูมิภาคคกที่	ภูมิภาคเคลื่อนที่	วิธีตรวจสอบ	
				UV	น้ำยาฟ่น
กลุ่ม/ ส่วนของเครื่องยา					
กลุ่มโกลู	-	-	Hexane : Ethyl acetate (40 : 60) Dichloromethane : Methanol (90 : 10)	-	10% KOH
	terpenoids	-	Hexane : Ethyl acetate (80 : 20) Hexane : Ethyl acetate (40 : 60) Dichloromethane : Methanol (97 : 3) Dichloromethane : Methanol (90 : 10)	-	Anisaldehyde/sulfuric acid 10% KOH
กลุ่มอบเชย	terpenoids	-	Hexane : Ethyl acetate (70 : 30) Dichloromethane : Methanol (90 : 10)	-	-
	terpenoids	-	Hexane : Ethyl acetate (80 : 20) Hexane : Dichloromethane : Methanol (12 : 80 : 12)	-	Anisaldehyde/sulfuric acid
ส่วนเถา	-	-	Dichloromethane : Methanol (90 : 10) Hexane : Dichloromethane : Methanol (12 : 80 : 12)	-	Anisaldehyde/sulfuric acid Natural product

เครื่องยา/ตำรับยา	กลุ่มสารสำคัญ	วิธภาคคองที่	วิธภาคเคลือบที่	วิธตรวจตอบ	
				UV	นํายาพ่น
ส่วนแทน	สารที่มี chromophore ในโครมสํราง	-	Dichloromethane : Methanol (90 : 10) Toluene : Ethyl acetate : Formic acid (50 : 45 : 5) Acetate : Formic acid : Water (80 : 10 : 10)	-	10% KOH Natural product
ส่วนดําน	สารที่มี chromophore ในโครมสํราง alkaloids	-	Hexane : Ethyl acetate (80 :20) Hexane : Dichloromethane : Methanol (12 : 80 : 12)	-	Anisaldehyde/sulfuric acid Dragendorff's
ลักษณะภายนอก	สารเรืองแสงภายใต้	-	Dichloromethane : Methanol (90 : 10)	-	Anisaldehyde/sulfuric acid
คํายาแห้ง	แสงอัลตราไวโอเลต (365 nm) terpenoids	-	Hexane : Ethyl acetate (97 : 3) Hexane : Dichloromethane : 95% Ethanol (41 : 49 : 10) Hexane : Dichloromethane : Ethyl acetate (90 : 5 : 5)	-	10% KOH
คํารับยา					
ยาหอมนวโกฐ/ ยาหอมอินทจักร์		Siliga gel GF254	Hexane : Ethyl acetate (1 : 1)	UV 254 nm UV 366 nm	Anisaldehyde/sulfuric acid Phosphomolybdic acid

เครื่องยา/ตำรับยา	กลุ่มสารสำคัญ	ภูมิภาคคกที่	ภูมิภาคเคลื่อนที่	วิธีตรวจสอบ	
				UV	นํายาพ่น
ยาจันทน์ลีลา		Siliga gel GF254	Hexane : Ethyl acetate (1 : 1)	UV 254 nm UV 366 nm	Anisaldehyde/sulfuric acid Phosphomolybdic acid
ยาเหลืองปิดสมุทร		Siliga gel GF254	Hexane : Ethyl acetate (1 : 1)	UV 254 nm UV 366 nm	Anisaldehyde/sulfuric acid Phosphomolybdic acid
เครื่องยาเดี่ยวในตำรับยาอายุวัฒนะ					
กิ่งต้น		Siliga gel GF254	Toluene : Ethyl acetate : Formic acid (50 : 50 : 5) Solvent front = 10 cm	-	Anisaldehyde TS
บอระเพ็ด		Siliga gel G	Hexane : Ethyl acetate : Glacial acetic acid (75 : 25 : 1) Solvent front = 12 cm	-	10% w/v phosphomolybdic acid in ethanol
			Chloroform : Methanol : Strong ammonia solution (75 : 20 : 5) Solvent front = 12 cm	-	1. acetic potassium iodobismuthate TS 2. iodoplatinate TS
แห้วหมู		Siliga gel GF254	Benzene : Ethyl acetate : Glacial acetic acid (92 : 5 : 5)	-	2, 4- dinitrophenyl hydrazine

เครื่องยา/ตำรับยา	กลุ่มสารสำคัญ	ภูมิภาคคกที่	ภูมิภาคเคลื่อนที่	วิธีตรวจสอบ น้ำยาพ่น
พริกไทยดำ		Siliga gel GF254	Hexane : Ethyl acetate (60 : 40) Solvent front = 12 cm	UV - 1. acetic potassium iodobismuthate TS 2. 50% v/v sulfuric acid in methanol

ยาหอมนว โภจและยาหอมอินทจักร์ ประกอบด้วยเครื่องยา 51 ชนิด รักษาอาการกลุ่มอาการทางระบบไหลเวียน (แก่ลม)

ขำจันทน์ลีลา ประกอบด้วยเครื่องยา 8 ชนิด เป็นยาแก้ไข้

ยาเหลืองปิดสมุทร ประกอบด้วยเครื่องยา 16 ชนิด รักษาอาการกลุ่มอาการทางระบบทางเดินอาหาร

* ยาทั้ง 4 รายการ มีเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะเป็นส่วนประกอบ

การค้นพบและการพัฒนายา

การค้นพบยาที่มีความเกี่ยวข้องกับเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการค้นหาโครงสร้างทางเคมีให้สามารถจับพอดีกับชีวโมเลกุลเป้าหมาย ทำให้เกิดฤทธิ์เป็นได้ทั้งการยับยั้งและการกระตุ้น เมื่อได้โมเลกุลที่มีรูปร่างพอดีกับเป้าหมายแล้ว นำไปทดสอบฤทธิ์ในสัตว์ทดลองเพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ในร่างกาย การค้นพบยาส่วนใหญ่มักเริ่มจากการค้นพบสารที่เป็นต้นแบบของยา (Lead) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเป็นครั้งแรก มีโครงสร้างสำคัญหรือฟาร์มาโคฟออร์ (Pharmacophore) ในการออกฤทธิ์ที่ยังไม่มีผู้ค้นพบมาก่อน อาจเป็นสารใหม่หรือสารที่มีอยู่แล้วแต่ยังไม่เคยมีการค้นพบมาก่อน อย่างไรก็ตาม สารต้นแบบอาจจะยังไม่ใช้เป็นยาได้ เนื่องจากมีข้อเสียบางประการ จึงต้องทำการพัฒนายา (Drug development) ต่อไป โดยสารต้นแบบสามารถค้นพบได้จาก 1) สารจากแหล่งกำเนิดธรรมชาติ เช่น พืช พืชของสัตว์ 2) ยาที่มีใช้กันอยู่แล้ว เช่น จากผลข้างเคียงของยา 3) สมมติฐานและขั้นตอนที่เป็นเหตุเป็นผลเกี่ยวกับโรค 4) สารที่เป็นเมแทบอลิซึมของยา และ 5) การประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์เข้าช่วยในการสร้างแบบจำลองโมเลกุล ซึ่งวิธีนี้มีประสิทธิภาพสูง ลดระยะเวลาและค่าใช้จ่าย (โอภา วัชรคุปต์, 2551)

การออกแบบยา

การออกแบบยา (Drug design) โดยอาศัยโครงสร้างสามมิติของชีวโมเลกุลเป้าหมาย เป็นการศึกษาบริเวณที่จับกับสารและทำให้เกิดฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Active site) ด้วยการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมแสดงโครงสร้างสามมิติ ซึ่งจะบอกได้ถึงขนาด ความมีขั้ว ตำแหน่งที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน และโอกาสที่จะเกิดอันตรกิริยาแบบต่างๆ ทำให้ทราบถึงขนาดของบริเวณที่จับและบริเวณที่เกิดอันตรกิริยากับสารออกฤทธิ์ โดยข้อมูลเหล่านี้จะถูกใช้เป็นพื้นฐานในการออกแบบสารออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเป้าหมายนั้นๆ ตรวจสอบได้ด้วยการทำ docking โมเลกุล (Molecular docking) แบ่งเป็น 4 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การเตรียมสาร (Ligand) ที่จะทดสอบ การเตรียมเป้าหมายที่จะทดสอบ การทดสอบหารูปแบบการจัดเรียงตัวของสารที่ตำแหน่งออกฤทธิ์ของเป้าหมาย และการประเมินผลลัพธ์ที่ได้ (Scoring) (Morris & Lim-Wilby, 2008)

การออกแบบยาโดยอาศัยข้อมูลโครงสร้างสามมิติของสารออกฤทธิ์ ศึกษาโดยใช้ข้อมูลโครงสร้างของสารออกฤทธิ์เพียงอย่างเดียว ใช้หลักการของการออกฤทธิ์อย่างจำเพาะของสารออกฤทธิ์ สารในกลุ่มที่คล้ายกันย่อมมีคุณสมบัติในการเกิดอันตรกิริยากับเป้าหมายได้คล้ายคลึงกัน เป็นหลักการในการค้นหาฟาร์มาโคฟออร์ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ ฟาร์มาโคฟออร์ที่ค้นพบจะถูกนำไปเป็นพื้นฐานในการออกแบบยาใหม่ วิธีการในปัจจุบัน

การสร้างความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่างส่วนของโครงสร้างกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เรียกว่า Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) โดยสร้างความสัมพันธ์เชิงเส้น

ระหว่างคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และขยายไปสู่การคำนวณด้านอื่นๆ เช่น การหาความสัมพันธ์ระหว่างส่วนของโครงสร้างกับคุณสมบัติที่สนใจ, การทำนายคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์จากโครงสร้าง (ADME) เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิคใดเทคนิคหนึ่งอาจไม่ตอบ โจทย์ที่สมบูรณ์ การประยุกต์ใช้เทคนิคที่หลากหลายรูปแบบส่งผลให้ได้ข้อมูลที่ยืนยันได้ดีขึ้น และยังคงต้องมีการทดสอบในห้องปฏิบัติการร่วมด้วย

โครงข่ายทางเภสัชวิทยา

โครงข่ายทางเภสัชวิทยา (Network pharmacology) เป็นการเพิ่มความสามารถในกระบวนการพัฒนา ยา โดยการสร้างรูปแบบเครือข่ายในทางปฏิบัติและทำนายเป้าหมายของยา ตามฐานข้อมูลสาธารณะหรือข้อมูลที่มีอยู่ของงานวิจัยก่อนหน้านี้ และสามารถสำรวจกลไกการทำงานของยาเพื่อคงความสมดุลภายในระบบ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างความเข้าใจกลไกทางเภสัชวิทยาในรูปแบบของโครงข่าย (W. Zhang, 2016) เพื่อให้เข้าใจโรคในระดับระบบและรู้ถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยาและร่างกายบนพื้นฐานทางทฤษฎีความสมดุลของโครงข่ายทางชีววิทยา เมื่อได้สารจากวิธีการคัดกรองแล้ว สารจะถูกนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติก่อนที่จะนำไปทดสอบในสัตว์ทดลอง โดยคุณสมบัติของสารที่ต้องวิเคราะห์ ประกอบด้วย 2 คุณสมบัติ ได้แก่ คุณสมบัติตามกฎของ Lipinski (Lipinski's Rule of Five) ต้องผ่านตามเกณฑ์ที่กำหนด (Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 2001) และ คุณสมบัติของ ADMET (ADMET Property) พื้นฐานทางทฤษฎีในการสร้างโครงข่ายทางเภสัชวิทยา ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ได้แก่ 1) เภสัชวิทยา (Pharmacology) เป็นการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตและสารชีวเคมีที่เกี่ยวข้อง 2) โครงข่ายทางชีววิทยา (Network biology) เป็นการศึกษาเครือข่ายในระดับเซลล์ถึงระบบโดยรวม 3) ชีววิทยาเชิงระบบ (Systems biology) ศึกษาองค์ประกอบโดยรวมทั้งหมดและปฏิสัมพันธ์ในระบบชีวภาพ เช่น ความหลากหลายของพันธุศาสตร์, เงื่อนไขของสิ่งแวดล้อม

หลายทศวรรษที่ผ่านมา ได้มุ่งเน้นไปที่การบำบัดแบบหลายเป้าหมายและแบบผสมผสานวิธีการเหล่านี้บรรลุประสิทธิภาพการรักษาอย่างมากโดยการปรับกิจกรรมของเป้าหมายในโรคที่ซับซ้อน เช่น การติดเชื้อ HIV-1 โรคมาเร็ง และโรคเบาหวาน โรคส่วนใหญ่ไม่สามารถรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพในแง่ของเป้าหมายของยีนเดี่ยว เนื่องจากเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานที่ประสานกันของกลุ่มยีนที่แตกต่างกัน ส่วนประกอบเซลล์ส่วนใหญ่ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพโดยการโต้ตอบกับส่วนประกอบเซลล์อื่นๆ และการโต้ตอบทั้งหมดเหล่านี้ร่วมกันแสดงถึงการโต้ตอบ การเชื่อมต่อระหว่างกันนี้แสดงให้เห็นว่าข้อบกพร่องในยีนตัวเดียวอาจไม่ได้จำกัดเฉพาะผลิตภัณฑ์ของยีนเอง แต่อาจแพร่กระจายไปตามเครือข่าย ดังนั้นการพัฒนาต้องขึ้นอยู่กับมุมมอง

ของเครือข่ายกลไกการเกิดโรคลาหลายเป้าหมายอาจมีประสิทธิภาพมากกว่า (Muhammad et al., 2018)

ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ (Natural products) มีบทบาทสำคัญในทางการแพทย์ เนื่องจากมีความสามารถในการจับและปรับเปลี่ยนเป้าหมายของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับโรค พืชสมุนไพรมีโครงสร้างที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายสำหรับการรักษาความผิดปกติหลายอย่าง ผลกระทบที่น้อยกว่า ราคาอ่อนโยม และการเข้าถึงที่ง่ายดาย แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการรักษาแบบดั้งเดิมโดยการระบุเป้าหมายทางเภสัชวิทยาจากสารออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพร ได้กลายเป็นสิ่งที่น่าสนใจสำหรับการวิจัยทางชีวการแพทย์ เพื่อสร้างวิธีการรักษาที่เป็นนวัตกรรมใหม่ สำหรับการตรวจสอบยาแผนโบราณอย่างเป็นระบบ (Noor et al., 2022) ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากยาแผนโบราณถือเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการค้นพบยาใหม่ๆ สูตรผสมสมุนไพรแบบดั้งเดิมประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมากและสามารถปรับเปลี่ยนเป้าหมายของโรคได้หลายชนิด เทคนิคใหม่ของเภสัชวิทยาเครือข่ายสามารถใช้เป็นเครื่องมือที่มีคุณค่าสำหรับความเข้าใจทางวิทยาศาสตร์ของยาแผนโบราณและการค้นพบยาในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Chandran, Mehendale, Tillu, & Patwardhan, 2015) ซึ่งผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติสามารถค้นหาจากฐานข้อมูลสาธารณะที่หลากหลาย เช่น Natural products databases (Sorokina & Steinbeck, 2020) Traditional Chinese medicine (R. Zhang, Zhu, Bai, & Ning, 2019)

โปรแกรมสำเร็จรูป

Cytoscape เป็นโปรแกรมแบบ Open source ที่ใช้สำหรับสร้างและวิเคราะห์เครือข่ายที่ซับซ้อนรวมถึงรวบรวมเครือข่ายการทำงานร่วมกันของชีวโมเลกุลเข้ากับข้อมูลการแสดงออกของยีนและลักษณะโมเลกุลอื่นๆ เข้าไว้ในกรอบแนวคิดที่เป็นหนึ่งเดียว โดยใช้ร่วมกับฐานข้อมูลขนาดใหญ่ของโปรตีน-โปรตีน โปรตีน-ดีเอ็นเอ และปฏิสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสำหรับมนุษย์และสิ่งมีชีวิตจำลอง การทำงานพื้นฐานของโปรแกรมจะทำการจัดวางและสอบถามโครงข่ายเพื่อรวบรวมข้อมูลการวิเคราะห์ และสร้างภาพเครือข่ายที่มีโปรไฟล์การแสดงออก (Expression profiles) ฟีนোটป์ (Phenotypes) และโมเลกุลอื่นๆ โดยเชื่อมโยงเครือข่ายกับฐานข้อมูลของคำอธิบายประกอบการทำงาน (Functional annotations) โปรแกรมสามารถใช้ร่วมกับส่วนเสริม (Plug-in) เพื่อช่วยให้สามารถพัฒนาการทำงานวิเคราะห์เครือข่ายและคุณสมบัติเพิ่มเติมได้อย่างรวดเร็ว (Shannon et al., 2003)



ภาพที่ 8 เครื่องหมายการค้าของโปรแกรมสำเร็จรูปที่ใช้ในงานค้นคว้าและพัฒนา

BinGo (The Biological Networks Gene Ontology tool) เป็นโปรแกรม JAVA แบบ Open source ภายใต้โปรแกรม Cytoscape ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย สำหรับใช้ระบุ Gene Ontology (GO) ที่มีการแสดงออกในชุดของยีน (A set of genes) โดยจะจับคู่รูปแบบการทำงานที่โดดเด่นของยีนผ่านการทดสอบข้อมูลแบบลำดับชั้นของยีนและทางสถิติ สามารถแสดงออกเป็นแผนภาพทางชีวภาพได้ (Maere, Heymans, & Kuiper, 2005)

JEPETTO (Java Enrichment of Pathways Extended To Topology) เป็นโปรแกรม JAVA แบบ open source ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ชุดยีนของมนุษย์ โดยจะระบุหน้าที่ที่เกี่ยวข้องระหว่างยีน (Genes) และ cellular pathways ที่รู้จัก กับกระบวนการโดยใช้เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนและการวิเคราะห์ทอพอโลยี (Topological analysis) โปรแกรมทำการรวมข้อมูลจากเว็บเซิร์ฟเวอร์สามแห่งที่เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ Enrichment analysis, Pathways expansion และ Topological matching (Winterhalter, Widera, & Krasnogor, 2014)

MCODE (Molecular Complex Detection) เป็นโปรแกรมเสริมภายใต้โปรแกรม Cytoscape ที่ใช้ที่ตรวจจับบริเวณที่เชื่อมต่อกันอย่างหนาแน่นในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและโปรตีนขนาดใหญ่ที่มีลักษณะเป็น โมเลกุลเชิงซ้อน โดยแสดงออกมาเป็นกลุ่มย่อยภายใต้วิธีการพื้นฐานของการจัดกลุ่มกราฟ วิธีการนี้ขึ้นอยู่กับ การถ่วงน้ำหนักจุดยอด (Vertex weighting) ตามความหนาแน่นของพื้นที่ใกล้เคียงและการเคลื่อนที่ออกไปด้านนอกจากโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูงในพื้นที่ (Bader & Hogue, 2003)

ฐานข้อมูลสาธารณะ



ภาพที่ 9 ตัวอย่างฐานข้อมูลสาธารณะที่ใช้ในงานออกแบบและพัฒนา

NPASS database (Natural Product Activity and Species Source) เป็นฐานข้อมูลผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural products (NPs)) สำหรับการค้นคว้ายาและการสำรวจกลไกการรักษาทางการแพทย์แผนโบราณและยาสมุนไพร โดยมีฐานข้อมูล โครงสร้างและข้อมูลอื่นๆ ประมาณ 470,000 โครงสร้าง และข้อมูลทางการทดลองต่างๆ ซึ่งมาจาก Experimental activity values และ Species sources เช่น IC_{50} , K_i , EC_{50} , GI_{50} หรือ MIC (X. Zeng et al., 2018) โดยในปี 2022 มีการอัปเดตข้อมูลใน Version 2.0 เพิ่มขึ้นเป็น 94,413 จาก 32,287 Source organisms มีข้อมูลทั้ง Plants, Bacteria, Fungi, Metazoan รวมถึงข้อมูล Activity records จำนวน 958,866 ข้อมูล Biological

targets จำนวน 7,753 ข้อมูล และ natural products จำนวน 96,481 ข้อมูล (Zhao et al., 2022) เข้าถึงได้จาก <https://bidd.group/NPASS>

SwissTargetPrediction เป็นฐานข้อมูลสารณะที่ถูกพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี 2014 โดย SIB Swiss Institute of Bioinformatics ซึ่งเป็นเว็บเซิร์ฟเวอร์ที่ใช้ทำนายเป้าหมายของโมเลกุลที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างแม่นยำ อาศัยหลักความเหมือนผ่านการคัดกรองย้อนกลับ อิงจากข้อมูลแบบ 2 มิติและ 3 มิติกับลิแกนด์ที่รู้จัก (Gfeller et al., 2014) ประกอบด้วยสารประกอบ 376,342 ชนิด เป้าหมายระดับโมเลกุลขนาดใหญ่ 3068 ชุด (Daina, Michielin, & Zoete, 2019) เข้าถึงได้จาก <http://www.swisstargetprediction.ch>

DisGeNet เป็นฐานข้อมูลสารณะที่ใหญ่ที่สุดแห่งหนึ่งของจีนที่เกี่ยวข้องกับโรคในมนุษย์ ซึ่งมีการรวบรวมข้อมูลจากผู้เชี่ยวชาญ GWAS catalogues, สัตว์ทดลอง และการทบทวนวรรณกรรมทางวิทยาศาสตร์ เวอร์ชันปัจจุบัน (v7.0) ประกอบด้วย 1,134,942 ยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค (Gene-disease associations; GDAs) และ 369,554 ความแปรปรวนที่เกี่ยวข้องกับโรค (Variant-disease associations; VDAs) เข้าถึงได้จาก <https://www.disgenet.org/home/> (Piñero et al., 2019)

การศึกษาระดับพรีคลินิก

การศึกษาระดับพรีคลินิกเป็นขั้นตอนของการศึกษาคูณสมบัติในการออกฤทธิ์ (Activity) และความเป็นพิษ (Toxicity) ของตัวยาที่ค้นพบ โดยทำการศึกษาอย่างละเอียดในเซลล์และสิ่งมีชีวิตเน้นคุณสมบัติการออกฤทธิ์ของยา เพื่อประเมินผลและกลไกการออกฤทธิ์ของยา การศึกษาทางเภสัชวิทยาของตัวยาวอย่างละเอียด และการศึกษาความเป็นพิษของยา ก่อนที่จะถูกนำไปศึกษาต่อในคน

การเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นการศึกษาพฤติกรรมและกระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นต่อเซลล์ในหลอดทดลอง (in vitro) สามารถออกแบบและควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมกับการศึกษา โดยไม่มีปัจจัยที่เข้ามารบกวนการทำงานของเซลล์ในสิ่งมีชีวิต ไม่มีความแตกต่างของเซลล์ (Homogeneity of cell type) ทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความสม่ำเสมอและใกล้เคียงกับการทดสอบเดิม การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมีประโยชน์หลากหลายด้าน เช่น การศึกษาระบบจำลอง (Model systems) ซึ่งเป็นพื้นฐานของเซลล์ทางชีววิทยา ปฏิกริยาระหว่างเซลล์และสารก่อโรค ผลกระทบของยา (Toxicity testing) การกระตุ้นการทำงานของเซลล์ รวมถึงการศึกษาทางโภชนาการ การศึกษาวิจัยโรคมะเร็ง การศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่อเซลล์ เป็นต้น โดยเซลล์ไลน์ (Cell lines) เป็นเซลล์ที่ได้มาจากการเก็บโดยตรงจากสัตว์ทดลอง แต่ถูกปรับให้มีคุณสมบัติเป็นอมตะ (Immortal) จากการเปลี่ยนแปลงบางอย่าง (Transformations) โดยส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์มะเร็งหรือ

เซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงด้วยไวรัส เซลล์ที่ใช้บ่อยที่สุด คือ เซลล์รังไข่จีนหนูแฮมสเตอร์ (CHO), เซลล์ SH-SY-5Y เป็นเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ประสาทของมนุษย์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาตำรับยากับการสร้างโครงข่ายทางเภสัชวิทยา

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกลไกที่มีประสิทธิภาพของยาต้ม Erxian (EXD) ที่ใช้ในการรักษาอาการที่เกี่ยวข้องกับวัยหมดระดู (menopause) ในการแพทย์แผนจีน ด้วยวิธีการทาง network pharmacological analysis พบว่ามีการระบุสารประกอบทั้งหมด 721 ชนิดใน EXD โดยสารประกอบ 155 ชนิด แสดงปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนที่เกี่ยวข้อง 2,656 ชนิด และสารประกอบจำนวน 210 ชนิด แสดงปฏิสัมพันธ์กับยีนที่เกี่ยวข้อง จำนวน 8,536 ชนิด โดยสารประกอบจำนวน 20 ชนิดมีความเกี่ยวข้องกับ 34 วิถีที่มีนัยสำคัญซึ่งมี 12 ยีนที่เกี่ยวข้องกับ menopause การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงส่วนผสมที่มีประสิทธิภาพของ EXD สำหรับบรรเทาอาการวัยหมดระดู (S. Wang et al., 2015)

การค้นหายาผ่านการใช้โครงข่ายทางเภสัชวิทยาในการทำนายพืชสมุนไพร 7,362 ชนิด ที่มีผลต่อรักษาการเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative disease) ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบจำนวน 58,147 ชนิด ที่มี oral bioavailability และการซึมผ่าน central nervous system (CNS) ที่ดี ในการศึกษาพบว่า เป้าหมายส่วนใหญ่ของพืชสมุนไพรอยู่ที่ Cytochrome P450 พืชสมุนไพรมากกว่า 400 ชนิดเข้าจับกับโปรตีน Heme oxygenase-1 (HO-1) และ Acetylcholinesterase (AChE) และมีผลที่นำสนใจของพืชสมุนไพรอื่นที่เกี่ยวข้องในกลไกการอักเสบของเซลล์ประสาท คือ โปรตีน Prostaglandin G/H synthase2 (COX-2) นอกจากนี้ยังพบเป้าหมายใหม่ในการป้องกันการเสื่อมของระบบประสาท ได้แก่ Cytochrome P450 19 (aromatase) (Ke et al., 2016)

การศึกษาสารออกฤทธิ์และวิถีที่สำคัญในการทำงานของยาต้ม Yinchenhao (YCHD) ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาความผิดปกติของตับและโรคที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมต่างๆ ด้วยวิธีการทาง network pharmacology หลังจากทำการคัดกรอง oral bioavailability (OB), drug-likeness (DL) และ intestinal epithelial permeability (Caco-2) พบสารประกอบทั้งหมด 34 ชนิด เป็นสารที่ถูกระบุว่ามียุทธภาพจำนวน 30 ชนิด โดยเกี่ยวข้องกับโปรตีนเป้าหมาย 217 ชนิด นอกจากนี้ยังพบวิถีที่สำคัญทั้งหมด 31 วิถี และมียีนที่เกี่ยวข้องกับโรค 16 classes การศึกษานี้ช่วยให้สามารถระบุสารประกอบที่มีศักยภาพและวิถีทางที่สำคัญใน ยาต้ม YCHD และได้แสดงให้เห็นกลไกการออกฤทธิ์ของ YCHD ในการรักษาโรคต่างๆ ผ่านวิถีที่หลากหลาย (Huang et al., 2017)

การศึกษาโครงข่ายทางเภสัชวิทยาของยาเม็ด Tong Sheng (TSTs) เพื่อรักษาอาการหลอดเลือดสมองตีบหลังจากการขาดเลือด (Cerebral ischemic reperfusion injury (CIRI)) ร่วมกับการทำ fingerprint และทดสอบในสัตว์ทดลอง พบว่า ตำรับยามีฤทธิ์เกี่ยวข้องกับการควบคุมความเครียดออกซิเดชัน การอักเสบ และการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยเกี่ยวข้องกับการเป้าหมาย Nrf2, IL-2 β , TNF, Bcl-2 และ Cyt-C ในวิธีการดำเนินของโรค และยังสามารถลดระดับของ pro-inflammatory cytokine (IL-1 β , TNF- α) และ pro-oxidative product levels (LPO, MDA) เพิ่มระดับของ anti-oxidative product (NO, SOD) ลดการแสดงออกของโปรตีน Nrf2 และ HO-1 (Liu et al., 2019)

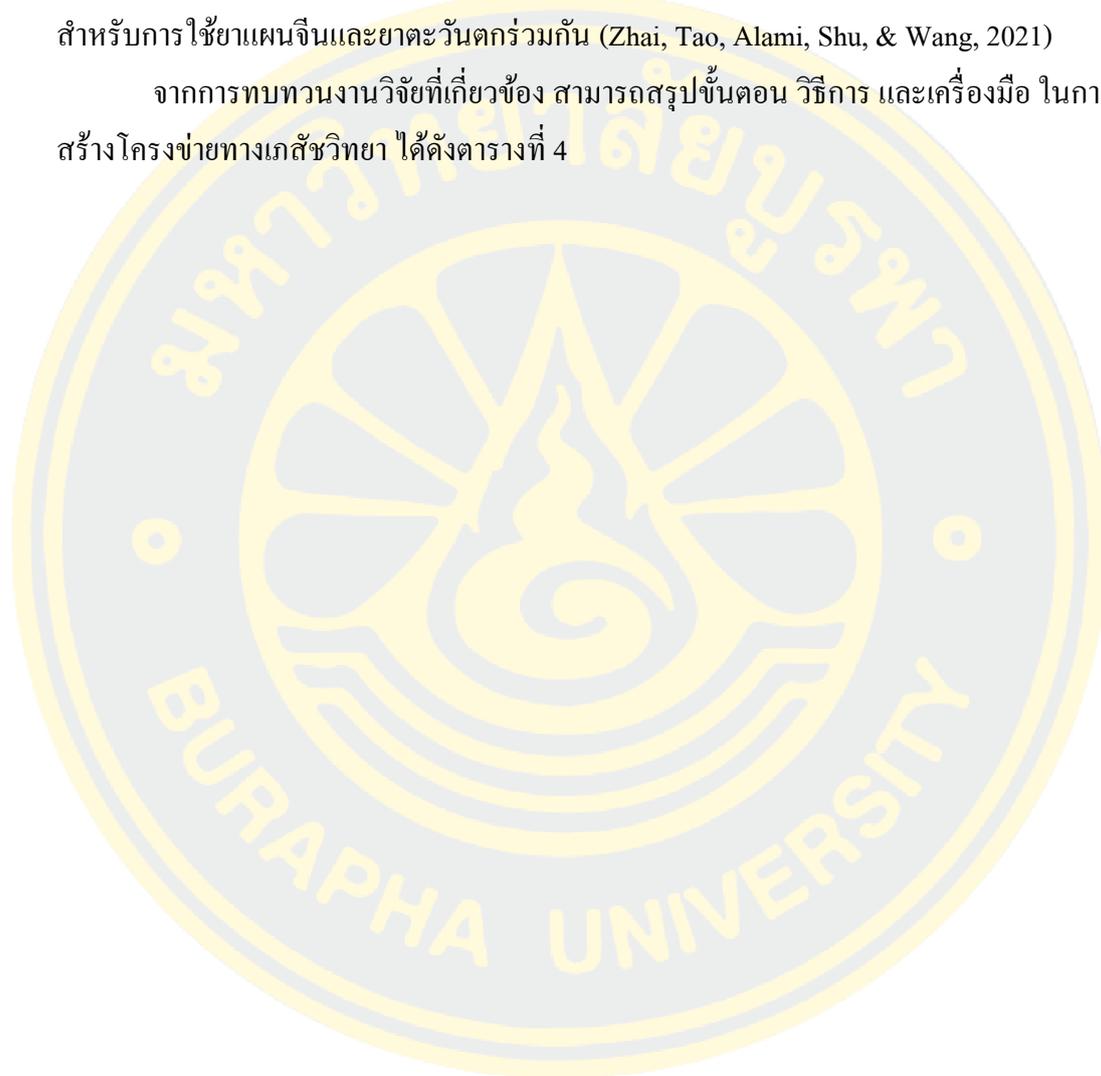
การศึกษายาตำรับ Chaihu Shugan San (CSS) ซึ่งเป็นยาที่มีการใช้ทางคลินิกในปรับปรุงการทำงานผิดปกติทางความคิดของ Alzheimer's disease (AD) โดยการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายกลไกแบบหลายเป้าหมายของ CSS ใน AD และตรวจสอบด้วยการทดลองในเซลล์ประสาท (PC12 cells) พบว่ามีการระบุสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทั้งหมด 152 ชนิดและมีเป้าหมายทางชีวภาพที่คาดการณ์ไว้ 520 รายการ ซึ่งมีเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับ AD จำนวน 160 รายการ โดยพบเป้าหมายหลักที่มีนัยสำคัญจำนวน 60 ชนิด เกี่ยวข้องกับกลไกทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway และ HIF signaling pathway เมื่อทำการทดสอบในเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตาย พบการเพิ่มขึ้นของ phosphorylation of Akt บ่งชี้ให้เห็นว่าเส้นทางการส่งสัญญาณของ Akt นั้นเกี่ยวข้องกับการป้องกันของ CSS ต่อการตายของเซลล์ประสาท (Q. Zeng et al., 2019)

การศึกษากลไกของสาร Hydroxysafflor yellow A (HSYA) ที่มีประสิทธิภาพในการรักษา Traumatic brain injury (TBI) แบบเฉียบพลัน โดยบูรณาการวิธีการ network pharmacology และสร้างแบบจำลองหนูทดลองเพื่อประเมินการทำงานของระบบประสาท (the controlled cortical impact (CCI) model) เป้าหมายหลัก (key targets) ที่ได้รับการยืนยันด้วยการทำ molecular docking เป็นสารเมตาโบไลต์ที่มีนัยสำคัญ 15 ชนิดซึ่งเกี่ยวข้องกับผลการรักษาของ HSYA ต่อ TBI เฉียบพลัน โดยเน้นไปที่ 4 เป้าหมายหลัก ได้แก่ NOS1, ACHE, PTGS2 และ XDH มีความเกี่ยวข้องอย่างมากในกระบวนการเมตาบอลิซึมในสมองส่วน cortex และ hippocampus (T. Li et al., 2021)

การศึกษาส่วนประกอบ (Effective components) และเป้าหมายที่สำคัญของ *Pinellia ternate* (โหระข้าวโพด) ซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายทางการแพทย์แผนจีนในการรักษาความดันโลหิตสูง ด้วยการทำ Network pharmacology จากการศึกษาพบว่ามี 12 effective components และ 88 targets ที่ผ่านการคัดกรอง และพบโมดูลโปรตีน 3 โมดูล เป้าหมายได้รับการวิเคราะห์โดย Gene Ontology (GO) enrichment analysis และ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

pathway หลักฐานข้างต้นแสดงให้เห็นว่ากลไกของ *P. ternata* ในการรักษาความดันโลหิตสูงส่วนใหญ่ส่งผลต่อการส่งสัญญาณประสาท (Nerve signal transmission) การเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation) และการตายของเซลล์ (apoptosis) ช่องแคลเซียม (calcium channels) ซึ่งมีความซับซ้อนเนื่องจากออกฤทธิ์ได้หลายวิธี การศึกษานี้จะช่วยให้มีพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ดีขึ้นสำหรับการใช้ยาแผนจีนและยาตะวันตกร่วมกัน (Zhai, Tao, Alami, Shu, & Wang, 2021)

จากการทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง สามารถสรุปขั้นตอน วิธีการ และเครื่องมือ ในการสร้างโครงข่ายทางเภสัชวิทยา ได้ดังตารางที่ 4



ตารางที่ 4 ขั้นตอนและเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาทาง Network Pharmacology

	Herbs or Remedy	Diseases	Methods (step by step)	Databases and Programs (step)	References
2015	Triphala Formulation	Several diseases	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mining Bioactives 2. Predicting Targets and Associated Diseases 3. Network Construction 	<ol style="list-style-type: none"> 1. UNPD 2. TTD 3. Cytoscape software 	(Chandran et al., 2015)
2015	Erxian decoction (EXD)	Menopause	<ol style="list-style-type: none"> 1. Identification of potential bioactive constituents 2. Druggability analysis 3. Identification of associated proteins and genes 4. identify the associated significant pathways 	<ol style="list-style-type: none"> 1-2. the TCM Database@Taiwan, TCMSP, literatures 3. STITCH, CTD 4. plug-in JEPETTO, DAVID 	(S. Wang et al., 2015)
2017	Yinchenhao decoction (YCHD)	Liver disorders, Metabolic diseases	<ol style="list-style-type: none"> 1. Identification of candidate compounds 2. Screening of active compounds 3. Identification of associated proteins and gene names 4. Identification of significant pathways and gene-associated diseases 5. Construction of a network and analyses 	<ol style="list-style-type: none"> 1-2. TCMSP 3. TCMSP, UniProtKB 4. plug-in JEPETTO, DAVID 5. DAVID, Cytoscape software 	(Huang et al., 2017)
2019	Chaihu Shugan San (CSS) herbal formula	Alzheimer's disease (AD)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Screening of chemical ingredients in CSS 2. Collection of compound-related targets and AD-related targets 3. Network construction and central network topological analysis 	<ol style="list-style-type: none"> 1. TCMSP 2. TCMSP, STITCH, SwissTargetPrediction, TTD, GeneCards, MalaCards 3. STRING, Cytoscape software 	(Q. Zeng et al., 2019)

Herbs or Remedy	Diseases	Methods (step by step)	Databases and Programs (step)	References
2021 Hydroxysafflor yellow A (HSYA)	Acute traumatic brain injury (TBI)	<p>4. GO and KEGG pathway enrichment analysis</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. The candidate targets of TBI 2. The molecular targets of HSYA 3. The predicted target of HSYA against TBI 4. A protein-protein interaction (PPI) network 5. The pathway and Gene Ontology (GO) enrichments of potential targets 6. The identified differential metabolites in metabolomics 7. The key metabolites and proteins were recognized 8. Molecular docking 	<p>4. DAVID</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. OMIM, TTD, TCMSP, GeneCards 2. STITCH, SwissTargetPrediction, ChEMBL, BATMAN-TCM 3. UniProtKB 4. STRING, Cytoscape software, plug-in in CytosHubba 5. plug-in ClueGO 6-7. Cytoscape software, plug-in MetScape 8. Autodock Vina 	(T. Li et al., 2021)
2021 <i>Pinellia ternate</i> (โหระข้ำวโพด)	Hypertension	<ol style="list-style-type: none"> 1. Construction of Protein-Protein Interaction Network and Screening of Key Targets <ol style="list-style-type: none"> 1.1 Screening the Effective Components and Targets of <i>P. ternate</i> 1.2 Screening Targets for Hypertension in Humans 1.3 Compound-Target Network Construction of Protein-Protein 	<ol style="list-style-type: none"> 1.1 TCMSP 1.2 GeneCards, OMIM, Pharmgkb, TTD 1.3 Cytoscape software 	(Zhai et al., 2021)

Herbs or Remedy	Diseases	Methods (step by step)	Databases and Programs (step)	References
		2. Interaction Network and Screening of Key Targets 2.1 Preliminary Construction of Protein-Protein Interaction Network 2.2 Cytoscape software 2.3 plug-in cytoNCA 2.2 Structure Optimization of Interaction Network 2.3 Screening of Key Targets	2.1 plug-in STRING 2.2 Cytoscape software 2.3 plug-in cytoNCA	
		3. Module Analysis of Protein-Protein Interaction Network 4. Go Functional Enrichment Analysis and KEGG Pathway Enrichment Analysis of Targets 5. Analysis of Molecular Docking and Action Forms of Effective Compounds	3. plug-in MCODE, plug-in BinGO GO, KOBAS 4. the R language package ClusterProfiler 5. LeDock software	

Databases: BATMAN-TCM: A Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm>), BindingDB: the Binding database

(<https://www.bindingdb.org>), ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl>), CTD: the Comparative Toxicogenomics Database (<http://ctdbase.org>), DAVID: the Database for Annotation, Visualization and

Integrated Discovery (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>), GeneCards: (<https://www.genecards.org>), GO: The Gene Ontology knowledgebase (<http://geneontology.org>), KOBAS

(<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/?t=1>), MalaCards (<https://www.malacards.org/pages/info>), OMIM: the Online Mendelian Inheritance in Man (<https://omim.org>), Pharmgkb: (<https://www.pharmgkb.org>),

STITCH: the Search Tool for Interactions of Chemicals and Proteins (<http://stitch.embl.de>), STRING: Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes and Proteins (<https://string-db.org>),

SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>), TCMSP: Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (<http://tcmspwx.com/tcmssp.php>), TTD: the

Therapeutic Targets Database (<http://db.idrblab.net/ttd>), the TCM Database@Taiwan (<http://tcm.cmu.edu.tw>), UniProt/UniProtKB: UniProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org>), UNPD: Universal

Natural Products Database (<https://bioregistry.io/registry/umprd>)

การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย D-galactose

เซลล์ SH-SY5Y เป็น Neuroblastoma cell line ที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาหน้าที่ของเซลล์ประสาท ความแตกต่าง การปลดปล่อยสารสื่อประสาท การเสื่อมของเซลล์ประสาท ความเป็นพิษต่อเซลล์ และผลของยาต้านมะเร็ง

ในปี 2018 มีการศึกษาผลของ *Crocus sativus* L. (หญ้าฝรั่น) ในการต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ SH-SY5Y ความเข้มข้น 5×10^3 cells/well โดยเติมสาร D-galactose 25–400 mM นาน 2 วัน หลังจากใส่สารทดสอบ 25–500 μ M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลพบว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ D-galactose โดยความเข้มข้นที่ 200 mM เพิ่มระดับ ROS ได้ถึง $132 \pm 22\%$ และเมื่อใส่สารทดสอบพบการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของ ROS ลดลง ในกลุ่มที่ได้รับ D-galactose 200 mM มีการแสดงออกของ carboxymethyl lysine (CML) ในโปรตีน AGE เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสารทดสอบสามารถลดความเป็นพิษของ D-galactose ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ ผ่านการยับยั้งการผลิต AGEs และ ROS (Heidari, Mehri, Shariaty, & Hosseinzadeh, 2018)

ในปี 2020 มีการศึกษาฤทธิ์ของ L-histidine, L-carnosine และสารผสม ในการปกป้องเซลล์ประสาท SH-SY5Y ความเข้มข้น 4×10^4 cells/well ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชราด้วย D-galactose ความเข้มข้น 200 mM นาน 48 ชั่วโมง ผลพบว่า สารทดสอบสามารถเพิ่ม proliferation, neurogenesis, และ senescence ในเซลล์ได้ โดยเพิ่มการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน β tubulin-III และ neurofilament heavy protein และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ GPx-1 SOD นอกจากนี้ยังควบคุมระดับ การแสดงออกของ amyloid β (1-42), caspase-3 และลดการควบคุม pro-inflammatory cytokines, interleukin (IL)-8, IL-1 β , และ tumor necrosis factor- α (Kim & Kim, 2020)

ในปี 2020 มีการศึกษาผลของ curcumin (Cur) และ hesperetin (Hes) และสารผสม ต่อการบ่งชี้ของความรู้คิดจากความชราของสมองจากการเหนี่ยวนำด้วย D-galactose ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ความเข้มข้น 6×10^4 cells/well เติมสาร D-galactose ในปริมาณ 300 mM นาน 3 วัน หลังจากใส่สารทดสอบ 24 ชั่วโมง และในหนูทดลอง ทำการฉีด D-galactose เข้า subcutaneous (s.c.) ปริมาณ 250 mg/kg BW เป็นระยะเวลา 3 เดือน การศึกษาพบว่าสารทดสอบสามารถเพิ่มความยาวและความชราของเซลล์ประสาท โดยลดจำนวนการย้อมสี β -gal ลดการควบคุมการแสดงออกของ p16 และ p21 และเพิ่มการควบคุมการแสดงออกของ antioxidant enzymes ได้แก่ SOD, GPx และ catalase ส่วนการได้รับสารทดสอบในหนูทดลองพบว่าสามารถยับยั้งการตายของเซลล์ใน cerebral cortex โดยควบคุมการแสดงออกของ Bax และ poly (ADP-ribose) polymerase

รวมถึง เพิ่มการแสดงออกของ Bcl-2 ซึ่งสารทดสอบอาจจะเป็นสื่อกลางในการป้องกันระบบประสาทในกระบวนกรชรา (Lee, Kim, Kim, Kim, & Kim, 2020)

ในปี 2023 มีการศึกษาผลของ *Panax japonicus* C.A. Meyer ในการปกป้องเซลล์ประสาทในเซลล์ SH-SY5Y ความเข้มข้น 6×10^4 cells/well ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย D-galactose ความเข้มข้น 200 mM นาน 48 ชั่วโมง ผลพบว่า สารทดสอบสามารถเพิ่มการทำงานของ mitochondrial ได้ โดยเพิ่มการควบคุมระดับโปรตีน mitofusin 2 (Mfn2) และ optic atrophy 1 (Opa1) รวมถึงลดการควบคุมระดับโปรตีน dynamin-like protein 1 (Drp1) (Fan et al., 2023)

การศึกษาในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม

การนำหนูทดลองมาใช้ในการศึกษา MCI ควรจะต้องแสดงลักษณะอย่างน้อย 2 ลักษณะดังต่อไปนี้ 1) แก่ 2) สูญเสียความจำเล็กน้อย 3) มีการเปลี่ยนแปลงทางประสาทวิทยาเพียงเล็กน้อย 4) มีการเปลี่ยนแปลงในระบบโคลิเนอร์จิก 5) มีการทำงานของมอเตอร์ หรือ พฤติกรรมการรับประทานอาหารที่ปกติ 6) มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดสมอง (Pepeu, 2004)

D-galactose ถูกนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำในกลุ่มสัตว์ฟันแทะ (rodents) อย่างแพร่หลายในการทดสอบความชรา การได้รับ D-galactose แบบต่อเนื่องจะทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์ประสาท (neuroinflammation) นำไปสู่ภาวะบกพร่องทางสติปัญญาและความจำบกพร่อง ซึ่งใช้เป็น Model ของภาวะสมองเสื่อมจากโรคอัลไซเมอร์ (Parameshwaran, Irwin, Steliou, & Pinkert, 2010) การศึกษาหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่าการแก่ชราของสมองที่เกิดจาก D-galactose ไม่เพียงแต่ทำให้เกิดความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย แต่ยังโดยการเพิ่มความเครียดในปฏิกิริยาออกซิเดชัน การอักเสบ และการตายของเซลล์ สิ่งเหล่านี้นำไปสู่ความเสื่อมถอยทางสติปัญญาได้ในที่สุด (Shwe, Pratchayasakul, Chattipakorn, & Chattipakorn, 2018) นอกจากนี้มีการตรวจสอบกลไกพื้นฐานของการเหนี่ยวนำให้หนูทดลองชนิด C57BL/6J เกิดการแก่ด้วยการเหนี่ยวนำด้วย D-galactose ผลทางพฤติกรรมของหนูทดลองที่ได้รับ D-galactose เป็นเวลา 2 เดือน ทำให้เกิดความจำและการเรียนรู้บกพร่องอย่างมีนัยสำคัญ จากระดับของ the metabolite methylglyoxal (MG) ที่สูงขึ้น (H. Li, Zheng, Chen, Liu, & Zhang, 2019)

ในปี 2011 มีการศึกษาโดยเหนี่ยวนำให้สมองหนูเกิดการแก่ด้วยการฉีดสาร D-galactose เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ในหนูอายุระหว่าง 2-3 เดือน เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ และให้สาร curcumin จำนวน 15 และ 30 mg/kg โดยวิธี oral gavage จากนั้นทำการทดสอบ Morris water maze และ Elevated plus maze ในวันที่ 20 และทดสอบอีกครั้งในวันที่ 21 และ 42 ผลการศึกษาพบว่า สามารถเพิ่มการรู้คิด, การเคลื่อนไหว, สมดุลของออกซิเดทีฟ และเรียกคืนการทำงานของ

Mitochondrial เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของ AChE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (A. Kumar, Prakash, & Dogra, 2011)

ในปี 2019 มีการศึกษาสาร Schisandrin (SCH) และ nootkatone (NKT) จากสมุนไพร *Alpinia oxyphylla-Schisandra chinensis* (ASHP) ต่อการเสื่อมของสมองหนูทดลองที่เกิดจาก $A\beta_{1-42}$ ผลพบว่า มีระดับของ TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ลดลงหลังการรักษา และยับยั้งเส้นทาง TLR4 / NF- κ B / NLRP3 ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการทำงานของ SOD, GST, COX-2, T-AOC และลดการทำงานของ iNOS, GSH, MDA และ NO (Qi et al., 2019)

ในปี 2022 มีการทดสอบผลของกรด p-Coumaric (PCA) ในการป้องกันเซลล์ประสาท (neuroprotective effects) ในหนูทดลองสายพันธุ์ Swiss albino mice ที่ได้รับ D-galactose ขนาด 150 mg/kg BW ได้ผิวหนัง ติดต่อกันเป็นเวลา 42 วัน ทดสอบด้วย Morris water maze test และ Y-maze ผลพบว่า การให้กรด PCA สามารถลดปริมาณความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก D-galactose และยับยั้งการทำงานของ AChE ในสมองหนูทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังสามารถลดระดับของการ nuclear factor kappa B (NF κ B) และ caspase3 ซึ่งเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (Daroi, Dhage, & Juvekar, 2022)

ในปี 2022 มีการศึกษาผลของ *Lepidium meyenii* Walp. (โสมเปรู) ในการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของ Hippocampus ในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้แก่ด้วย D-galactose โดยการฉีดผ่านช่องท้อง ผลการศึกษาพบว่า สารทดสอบสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจาก oxidative stress เพิ่มการทำงานของ GSH-Px, ลดระดับ MDA ซึ่งสามารถยับยั้งการตายของเซลล์และการแสดงออกของโปรตีน caspase 3 และ P53 ได้ (Zhou et al., 2022)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

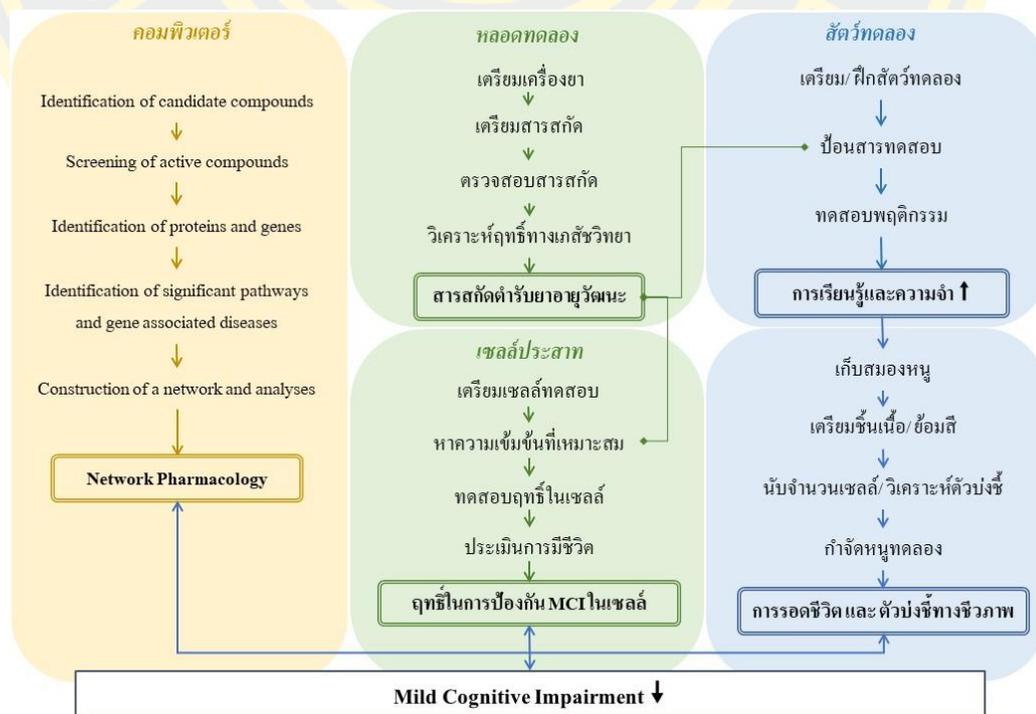
จากวัตถุประสงค์การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในการป้องกันการเกิด Mild cognitive impairment (MCI) สามารถแบ่งวิธีดำเนินการวิจัยได้เป็น 3 ระยะ (ขั้นตอนดังภาพที่ 10) ดังนี้

ระยะที่ 1 ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยาอายุวัฒนะผ่าน โครงข่ายทางเภสัชวิทยา (Network pharmacology) โดยใช้ฐานข้อมูลสาธารณะและโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (*in silico*)

ระยะที่ 2 เตรียมสารสกัดและศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะใน เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (Human neuroblastoma cells, SH-SY5Y) ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาท ด้วย D-galactose (*in vitro*)

ระยะที่ 3 ศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับทิศทางและสถานที่ (Spatial memory) ในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI ด้วย D-galactose หลังจากรับการป้อนสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ และตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biomarkers) ที่สำคัญ (*in vivo*)

แผนผังขั้นตอนการดำเนินการวิจัยในแต่ละระยะ



ภาพที่ 10 ขั้นตอนการศึกษาในแต่ละระยะ

ระยะที่ 1 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยาอายุวัฒนะผ่านโครงข่ายทางเภสัช

วิทยา

การศึกษาระยะนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำนายวิธีการออกฤทธิ์ของตำรับยาอายุวัฒนะในการป้องกันการเกิด MCI โดยค้นหาโครงสร้างสารออกฤทธิ์ (Active compounds) โปรตีนเป้าหมาย (Drug targets) และการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเครื่องยา สารออกฤทธิ์ และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ MCI ผ่านฐานข้อมูลสาธารณะ (Databases) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (*in silico*) และสร้างเป็นโครงข่ายทางเภสัชวิทยา (Network pharmacology)

เครื่องมือในการศึกษา

1. วัสดุอุปกรณ์
 - คอมพิวเตอร์: ระบบประมวลผล Intel(R) Core(TM) i7-1065G7 CPU @ 1.30GHz 1.50GHz หน่วยความจำ 8.00 GB ระบบปฏิบัติการ 64-bit Operating System, x64-based processor
2. โปรแกรมสำเร็จรูป
 - Cytoscape version 3.9.1 เป็นโปรแกรมสำหรับสร้างและวิเคราะห์เครือข่ายปฏิสัมพันธ์ในระดับโมเลกุล แสดงให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์และรูปแบบของเครือข่ายระหว่างโปรตีนที่สนใจ สามารถดาวน์โหลดได้จาก <http://www.cytoscape.org/>
 - Plugins โปรแกรมส่วนเสริมของ Cytoscape สามารถเข้าถึงได้จาก Apps >> App Manager... >> ค้นหาโปรแกรมส่วนเสริมในช่อง search >> กด install
 - JEPETTO version 1.31 สำหรับวิเคราะห์ human gene set และ topological ของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์
 - MCODE version 2.0.0 สำหรับวิเคราะห์กลุ่มย่อยของเครือข่าย บนพื้นฐานของ topology ที่เชื่อมต่อกันหนาแน่น
 - BinGO version 3.0.4 สำหรับ Calculates overrepresented GO terms in the network and display them as a network of significant GO terms.
 - Microsoft® Excel® for Microsoft 365 MSO (Version 2302) 64-bit
2. ฐานข้อมูลสาธารณะ (Databases)
 - The Natural Product Activity and Species Source Database: NPASS (<http://bidd.group/NPASS/index.php>) (X. Zeng et al., 2018)

- Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases
(<https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search>)
- Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform: TCMSP (<https://tcmsp-e.com/index.php>)
- SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>)
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>)
- Venn Diagram (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)
- The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery: DAVID
(<https://david.ncifcrf.gov>)

วิธีการศึกษา

1. ค้นหาโครงสร้างสารประกอบของเครื่องยา (Identification of natural compounds)

สืบค้นโครงสร้างสารประกอบ (Natural compounds) ของเครื่องยาอายุวัฒนะ 6 ชนิด ประกอบด้วย เปลือกทังถ่อน (*Albizia procera* (Roxb.) Benth.) เปลือกตะโกนา (*Diospyros rhodcoalyx* Kurz) บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson) หัวหญ้าแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) เมล็ดข่อย (*Streblus asper* Lour.) และเมล็ดพริกไทย (*Piper nigrum* L.) โดยใช้ช่องทางพฤกษศาสตร์ในการค้นหาสารประกอบ จากฐานข้อมูล NPASS และ Dr.Duke's ร่วมกับการทบทวนวรรณกรรมและตำรามาตรฐานสมุนไพร (THP) ทำการจัดเก็บข้อมูลลงโปรแกรม Microsoft Excel (ตัวอย่างการลงข้อมูลดังภาพที่ 11)

	A	B	C	D
1	Botanicals	PC ID	Bioactivity	BA_Attrb.
2	Albizia procera (Roxb.) Benth.	72	Protocatechuic Acid	BA
3	Albizia procera (Roxb.) Benth.	126	4-Hydroxybenzaldehyde	BA
4	Albizia procera (Roxb.) Benth.	1183	Vanillin	BA
5	Albizia procera (Roxb.) Benth.	2214	Apocynin	BA

ภาพที่ 11 ตัวอย่างการลงข้อมูลสารประกอบเครื่องยาใน โปรแกรม Excel

2. คัดเลือกโครงสร้างที่เหมาะสมในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Screening of bioactive compounds)

นำโครงสร้างสารประกอบที่ได้ จากข้อ 1 ไปทำการตรวจสอบทางเภสัชวิทยาเบื้องต้น พิจารณาเกณฑ์จากลักษณะทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic properties) (Huang et al., 2017) โดยกำหนดให้ผ่านเกณฑ์อย่างน้อย 2 ข้อ ต่อไปนี้

2.1 Oral Bioavailability (OB) เป็นหนึ่งในตัวชี้วัดที่สำคัญของ ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) โดยโครงสร้างที่มีค่า OB $\geq 30\%$ ถือว่ามีค่า OB ที่ดี ยิ่งค่า OB สูง ยิ่งมีส่วนในการกำหนดค่า DL ของ โมเลกุล

2.2 Intestinal epithelial permeability (Caco-2 cells) เป็นความสามารถในการซึมผ่านในลำไส้เล็ก มีความสำคัญในการพิจารณาการดูดซึมยา (Absorption) โครงสร้างยาที่มีค่า Caco-2 > -0.40 ถือว่าดูดซึมได้ดี

2.3 Drug-Likeness (DL) เป็นค่าที่ช่วยคัดสรรประกอบที่ดี และอัตราการจับกับเป้าหมาย โดยค่า DL ≥ 0.18 ถือเป็นค่าที่ดี

2.4 Lipinski's rule (LR) of five ต้องผ่านเกณฑ์ทั้งหมด 4 ข้อ ได้แก่

- 1) น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) ≤ 500
- 2) ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วนที่ได้จากการคำนวณ (CLogP) ≤ 5
- 3) จำนวนตัวให้พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond donor) ≤ 5
- 4) จำนวนตัวรับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond acceptor) ≤ 10

3. ค้นหาโปรตีนเป้าหมายของสารประกอบเครื่องยา (Identification targets of bioactive compounds)

สืบค้นโปรตีนเป้าหมาย (Protein targets) จากฐานข้อมูล SwissTargetPrediction โดยนำโครงสร้างของสารประกอบที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.2 มาค้นหาโปรตีนเป้าหมายจากใช้ SMILES เป็นตัวค้นหา ทำการจัดเก็บข้อมูลลงโปรแกรม Microsoft Excel (ตัวอย่างการลงข้อมูลดังภาพที่ 12)

	A	B	C	D	E
1	Bioactive	Uniprot ID	Target	Common name	TA_Attrb.
2	(-)-(R)-Mellein	P30542	Adenosine A1 receptor	ADORA1	TA
3	(-)-(R)-Mellein	P29274	Adenosine A2a receptor	ADORA2A	TA
4	(-)-(R)-Mellein	Q9GZT9	Egl nine homolog 1	EGLN1	TA
5	(-)-(R)-Mellein	P41594	Metabotropic glutamate receptor 5	GRM5	TA

ภาพที่ 12 ตัวอย่างการลงข้อมูลโปรตีนเป้าหมายของสารประกอบเครื่องยาในโปรแกรม Excel

4. ค้นหาโรคที่เกี่ยวข้องกับโรค (Identification targets of diseases)

นำโปรตีนเป้าหมาย (Protein targets) ที่ได้จากข้อ 2.3 มาทำการค้นหาโรคที่เกี่ยวข้องกับการเกิด Mild cognitive impairment (MCI) จากฐานข้อมูล DisGeNET โดยเลือก genes และระบุ gene name ที่ต้องการสืบค้นได้ลงในช่องค้นหา

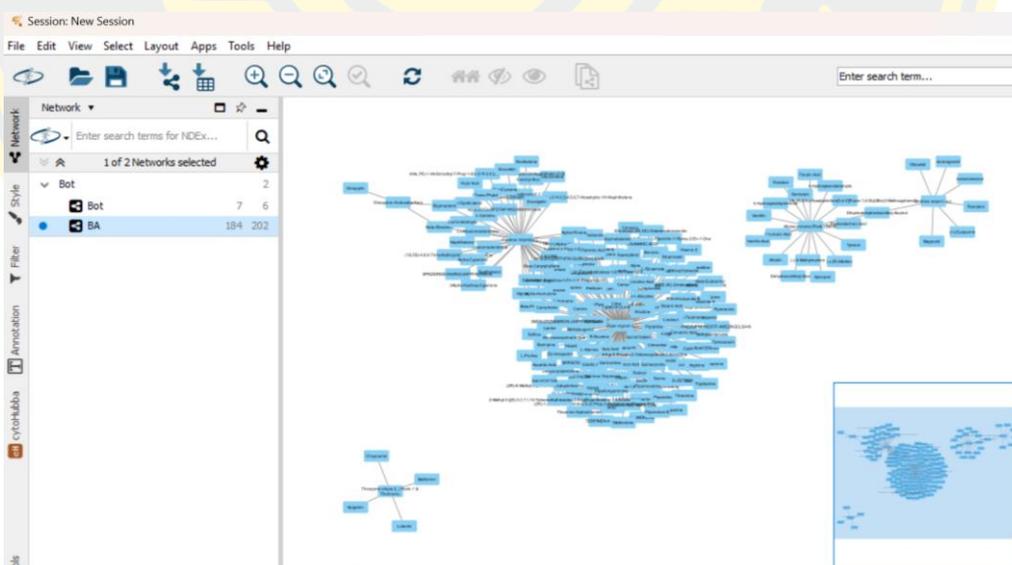
เข้าสู่ข้อมูลที่เกี่ยวข้องจาก Summary of Gene-Disease Associations และทำการเลือกคำค้นที่เกี่ยวข้องกับโรค ดังนี้ “Mild cognitive impairment” “Cognitive deterioration” และ “Age-related cognitive decline” โดยเลือกที่ Add/Remove filter ระบุโรค (Disease) และแหล่งที่มา (Source) เป็น CTD Human ทำการดาวน์โหลดข้อมูล (ตัวอย่างการลงข้อมูลดังภาพที่ 13)

	A	B	C	D
1	Gene	DiseaseID		Dis_Attrb.
2	ACE	C1270972	Mild cognitive disorder	DIS
3	ACHE	C1270972	Mild cognitive disorder	DIS
4	ACVRL1	C1270972	Mild cognitive disorder	DIS
5	ADORA2A	C1270972	Mild cognitive disorder	DIS

ภาพที่ 13 ตัวอย่างการลงข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับโรคของสารประกอบในโปรแกรม Excel

5. สร้างโครงข่ายและวิเคราะห์ข้อมูล (Construction of a network and analyses)

เชื่อมต่อโครงข่ายของข้อมูลและปฏิสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม Cytoscape ในการสร้างโครงข่าย นำเข้าข้อมูลปฏิสัมพันธ์จากไฟล์ Excel ที่ทำการบันทึกไว้ลงในโปรแกรม ระบุ nodes และ targets ของแต่ละไฟล์เพื่อใช้ในการเชื่อมปฏิสัมพันธ์ จากนั้นทำการเชื่อมปฏิสัมพันธ์ด้วย Advanced network merge ทำการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ด้วย Network analyzer ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจองค์ประกอบและโครงสร้างของเครือข่ายทางชีวภาพ



ภาพที่ 14 การเชื่อมต่อโครงข่ายด้วยโปรแกรม Cytoscape

6. กำหนดวิถีที่มีนัยสำคัญของเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ (Identification of significant pathways)

นำโครงข่ายที่ได้มาวิเคราะห์วิถีด้วย JEPETTO (Java Enrichment of Pathways Extended to Topology) ซึ่งเป็นปลั๊กอินภายใต้โปรแกรม Cytoscape ในการวิเคราะห์วิถีที่มีนัยสำคัญของโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษากับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ด้วย human gene sets ผ่าน KEGG pathway analysis ค่า XD-score ที่แสดง บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ของระยะทางเฉลี่ยของโครงข่ายทั้งหมด

7. วิเคราะห์โมดูลที่สำคัญในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ (Module analysis)

นำโครงข่ายที่ได้มาวิเคราะห์โมดูลด้วยโปรแกรม MCODE ซึ่งเป็นปลั๊กอินภายใต้โปรแกรม Cytoscape ในการวิเคราะห์เครือข่ายย่อยที่มีการเชื่อมต่อกันอย่างหนาแน่นจากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษากับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ กำหนดค่าเป็น default ทำให้ได้โมดูลย่อยที่มีความสำคัญในเครือข่าย

จากนั้นนำแต่ละโมดูลที่ได้มาทำการค้นหา Gene ontology ด้วยโปรแกรม BinGO กำหนดค่า a significant level = 0.05 การแสดงผลแต่ละโมดูลเน้นบทบาททางชีวภาพของ gene ontology ในกลุ่มกระบวนการทางชีวภาพ (biological process)

8. เปรียบเทียบกลไกทางชีวภาพกับการตอบสนองทางสรีรวิทยา (GO and KEGG pathway enrichment analysis)

นำโครงข่ายที่ได้ที่ได้มาแปลผลเปรียบเทียบกลไกทางชีวภาพกับการตอบสนองทางสรีรวิทยา KEGG pathway enrichment analysis ด้วยฐานข้อมูล DAVID enrichment analysis

ระยะที่ 2 การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ และทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม

การศึกษาระยะนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมด้วยสารดีกาแลคโตส (D-galactose) ซึ่งเร่งกลไกให้เกิดการแก่และตายของเซลล์จากการเพิ่มความเครียดออกซิเดชันและการอักเสบของเซลล์ เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาท

การทดลองที่ 2.1 การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

การทดลองนี้เป็นการเตรียมสารสกัดและตรวจสอบตำรับยาอายุวัฒนะตามวิธีการมาตรฐาน เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบผลของตำรับยาในเซลล์ประสาท และในหนูทดลอง

เครื่องมือในการศึกษา

1. เครื่องยา

- เปลือกกิ่งถ่อน (*Albizia procera* Benth.) 500 กรัม
- เปลือกตะโกนา (*Diospyros rhodcalyx*) 500 กรัม
- บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* L.) 500 กรัม
- หัวหญ้าแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) 500 กรัม
- เมล็ดข่อย (*Streblus asper* Lour.) 250 กรัม
- เมล็ดพริกไทยดำ (*Piper nigrum* L.) 250 กรัม

2. สารเคมี

2.1 สกัดสาร

- 95% Ethanol

2.2 TLC

- Dichloromethane 99.5% (Loba Chemie, India)
- Ethyl acetate 99.5% (Loba Chemie, India)
- Hexanes (Kemaus, Australia)
- Methanol 99.8% (Loba Chemie, India)
- p-Anisaldehyde (Sigma-Aldrich, Germany)
- Acetic acid glacial (VWR, China)
- Sulfuric acid 98% (Loba Chemie, India)

- Phosphomolybdic acid (Himedia, India)

2.3 Total phenolic content

- DI water
- Absolute Ethanol
- Gallic acid
- Sodium carbonate
- (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)
(Sigma-Aldrich, Germany)

2.4 DPPH radical scavenging assay

- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (SRL, India)
- Gallic acid

2.5 Ferric reducing power (FRAP) assay

- Folin-Ciocalteu phenol reagent
- Na₂CO₃
- 2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (SRL, India)

2.6 ABTS

- 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)

3. วัสดุอุปกรณ์

- กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Filter papers: 125 mm, diameter) (Whatman, USA)
- เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ (Schott Duran, Germany; Pyrex, USA)
- เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
- เครื่องบดละเอียด (Grinding machine)
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) (Senco®, China)
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลต (Microplate reader)
- แผ่นโครมาโทกราฟีแบบบาง ชนิด Silica gel GF₂₅₄ (TLC) (Loba chemie, India)
- แว่นขยาย 10x
- ถาดอลูมิเนียม (Aluminium plate)
- พาราฟิล์ม (Parafilm M) (Bemis®, USA)
- ปากคีบสแตนเลส (Forcep)

- ปิเปตอัตโนมัติ (Auto pipettes) ขนาด 1,000 μ l
- ปิเปต ทิป (Pipette tips) ขนาด 1,000 μ l
- หลอดเซนตริฟิวก์ (Centrifuge tubes) ขนาด 15, 50 ml (Costar Corning, USA)
- หลอดเอพเพนดอร์ฟ (Eppendorf tube) ขนาด 1.5 ml (Costar Corning, USA)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Thermo,)
- ตู้เก็บอุณหภูมิต่ำ (Freezer, -20 C)
- ตู้มีดภายใต้แสง UV (Fluorescence analysis cabinet) (Spectroline®, USA)
- อลูมิเนียมฟอยล์
- แร้ง ขนาด 600 μ m หรือ 30 mesh
- ถาดหลุม (96 well plate flat)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge machine)
- ถุงมือยางทางการแพทย์ แบบไม่มีแป้ง (Examination glove) (Sritrang, Thailand)
- ขวดสเปรย์แก้ว ทำ TLC

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

เตรียมเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะ

นำเครื่องยาที่ได้แต่ละชนิด (แหล่งที่มาและส่วนที่ใช้แสดงดังตารางที่ 5) มาตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องยาทั้ง 6 ชนิด เทียบกับตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia; THP) ร่วมกับการตรวจสอบเครื่องยาจากผู้เชี่ยวชาญทางด้านพฤกษศาสตร์ และยื่นขอหมายเลขตัวอย่างอ้างอิงเครื่องยา (Voucher specimens) จากพิพิธภัณฑ์สมุนไพร กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

ตารางที่ 5 แหล่งที่มาของเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะ

ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	แหล่งที่มา
ทังถ่อน	<i>Albizia procera</i> (Roxb.) Benth.	เปลือก	ร้านบ้านฮั่วตั้ง จังหวัดพิษณุโลก
ตะโกนา	<i>Diospyos rhodcalyx</i> Kurz	เปลือก	ร้านบ้านฮั่วตั้ง จังหวัดพิษณุโลก
บอระเพ็ด	<i>Tinospora crispa</i> (L.)	เถา	ร้านบ้านฮั่วตั้ง จังหวัดพิษณุโลก
หญ้าแห้วหมู	<i>Cyperus rotundus</i> L.	หัวแห้ง	ร้านบ้านฮั่วตั้ง จังหวัดพิษณุโลก
ข่อย	<i>Streblus asper</i> Lour.	เมล็ด	ร้านบ้านฮั่วตั้ง จังหวัดพิษณุโลก

ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	แหล่งที่มา
พริกไทยดำ	<i>Piper nigrum</i> L.	เมล็ด	ร้านบ้านฮั่วตั้ง จังหวัดพิษณุโลก

ตรวจสอบลักษณะทางมหภาค (Macroscopical characteristics) ของเครื่องยาทั้ง 6 ชนิด โดยตรวจสอบลักษณะภายนอกของวัตถุดิบด้วยตาเปล่าและใช้แว่นขยาย 10x คุณลักษณะ รูปร่าง ขนาด สี (ภายนอก/ภายใน) กลิ่น และรส เทียบกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ตรวจสอบปริมาณสิ่งแปลกปลอม (Foreign matters) หรือสิ่งสกปรกต่าง ๆ เช่น เชื้อรา แมลง ฟัน หิน หรือส่วนของพืชที่ไม่ต้องการ โดยเลือกสุ่มตัวอย่างสมุนไพรแห้งจำนวน 250-500 กรัม (ราก เหง้า เปลือก ต้น ใช้ 500 กรัม ใบ ดอก เมล็ด ใช้ 250 กรัม) นำมาเกลี่ยในถาดอลูมิเนียม แล้วคัดแยกสิ่งแปลกปลอมด้วยตาเปล่าหรือใช้แว่นขยาย 10x ชั่งน้ำหนักสิ่งแปลกปลอมที่ได้ หากมีสิ่งแปลกปลอมเกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก ให้ทำการเปลี่ยนแหล่งวัตถุดิบและทำการตรวจสอบใหม่อีกครั้งจนได้เครื่องยาที่ได้คุณภาพ (ตัวอย่างการตรวจหาสิ่งแปลกปลอมดังภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ตัวอย่างการตรวจหาปริมาณสิ่งแปลกปลอมในเมล็ดข่อย

เตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

หลังจากผ่านการตรวจสอบเครื่องยาและการทำความสะอาดแล้ว นำเครื่องยาทั้ง 6 ชนิด มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องอบลมร้อน (Hot air oven) จนแห้ง (ดังภาพที่ 16) จากนั้นจึงนำมาบดร่อนผ่านร่อนแรงขนาด 600 μm (หรือ 30 mesh) เก็บผงยาที่ได้ใน ที่แห้ง อุณหภูมิห้อง พ้นจากแสง



ภาพที่ 16 เครื่องยาที่ผ่านการอบ และนำไปบด

ทำการสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการหมัก (Maceration) โดยนำผงสมุนไพรชนิดละ 200 กรัม มาผสมกัน แบ่งใส่ขวดชมพู่ที่มีฝาปิด เติม 95% Ethanol ปริมาณ 5 เท่าของน้ำหนักยา ทิ้งไว้และเขย่าบ่อย ๆ นาน 3 วัน รินเอาสารสกัดออก โดยบีบเอาสารละลายออกจากกาก นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง นำกากที่ได้ไปสกัดซ้ำด้วยวิธีการเดิมอีก 2 ครั้ง (สิริเพ็ญ เลื่อนเชย & สิรินทร์น์ เตียงกุล, 2551)

นำสารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ครั้งมาผสมกันและนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Rotary evaporator) แสดงดังภาพที่ 17 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยต่อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนสารสกัดน้ำหนักคงที่ เก็บสารสกัดในขวดแก้วที่บดแสงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการศึกษาต่อ



ภาพที่ 17 เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Rotary evaporator)

การตรวจสอบสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

คำนวณหาปริมาณของสารสกัด (Extraction yield; EY)

นำสารสกัดที่ได้มาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จากนั้นนำมาคำนวณเป็นร้อยละ ปริมาณสารสกัด (% yield) จากสูตร

$$\% \text{ yield (w/w)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดที่ได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักของผงยาที่ใช้ (กรัม)}} \times 100$$

ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography; TLC)

หยดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 5 μl เป็นแถบยาวลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีแผ่นบาง ชนิดอลูมิเนียมที่เคลือบด้วย Silica gel GF254 ขนาด 3x17 เซนติเมตร นำไปวางในภาชนะทำโครมาโทกราฟีที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ต่างชนิดกัน (hexane : dichloromethane; ethyl acetate : hexane; dichloromethane : methanol) เมื่อวัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนไปบนแผ่นโครมาโทกราฟีได้ระยะทาง 15 เซนติเมตร นำแผ่น โครมาโทกราฟีออกมาวางให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และพ่นด้วยน้ำยาพ่น Anisaldehyde-sulfuric acid และ Phosphomolybdic (แผ่นละ 1 ชนิด) แล้วนำไปอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที จนสารเกิดปฏิกิริยาแสดงเป็นแถบสีชัดเจน ตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติและแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพร

วิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content; TPC)

ดัดแปลงจากวิธีการของ Folin-Ciocalteu (Folin and Ciocalteu, 1927)

นำ Stock solution ของสารสกัดมาเตรียมให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 2 mg/ml ใน 95% Ethanol เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent (10% v/v) และสารละลาย Sodium carbonate (7.5% w/v) ใน DI water จากนั้นเตรียมสารละลาย BHT ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน Absolute ethanol เพื่อใช้เป็น Positive control

จากนั้นเติมสารลงใน 96-well plate อัตราส่วน คือ สารทดสอบ : Folin-Ciocalteu phenol reagent (10% v/v) : Sodium carbonate (7.5% w/v) ปริมาตรเท่ากับ 20 : 100 : 80 μl ต่อหลุม ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มีอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content; TPC) เทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ที่ระดับความเข้มข้น 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ ใน 95% เอทานอล รายงานผลเป็นมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of GAE equivalent/ g of extract)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Scavenging activity)

- DPPH radical scavenging assay โดยใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นน้ำยาทดสอบ คัดแปลงจากวิธีการของ (ชนัญ ผลประไพ, 2562)

นำ Stock solution ของสารสกัดมาเตรียมให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 10 mg/ml ใน 95% Ethanol เตรียมสารละลาย DPPH (2.4% w/v) ใน Absolute ethanol เก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารสกัดลงใน 96-well plate จำนวนหลุมละ 100 μ l และเติม DPPH ปริมาณ 100 μ l ตั้งทิ้งไว้ในที่มีอุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

คำนวณ % scavenging เทียบกับมาตรฐาน Trolox ที่ระดับความเข้มข้น 100, 50, 25 μ g/ml ใน Absolute ethanol โดยคำนวณดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ scavenging (DPPH)} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

กำหนดให้ A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสารละลาย DPPH

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสารละลาย DPPH ผสมกับสารตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน

รายงานผลเป็นมิลลิกรัมของโทลอกซ์ต่อกรัมของสารสกัด (mg of Trolox equivalent/ g of extract)

- ABTS radical cation decolorization assay คัดแปลงจากวิธีการของ Arnao และคณะ (2001)

นำ Stock solution ของสารสกัดมาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml เตรียม ABTS working reagents โดยเตรียม (A) สารละลาย ABTS 96.02 mg ใน Acetic acid buffer pH 4.5 ปริมาตร 25 ml และ (B) สารละลาย Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ใน Acetic acid buffer pH 4.5 ปริมาตร 100 ml เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส นำสารละลาย A และ B มาอย่างละ 5 ml ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิห้อง 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้จำนวน 2.8 ml มาผสมใน Acetic acid buffer pH 4.5 ปริมาตร 65 ml เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิห้อง 30 นาที ก่อนนำไปทดสอบ ใช้สารละลาย BHT ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน Absolute ethanol เป็น Positive control

เติมสารทดสอบลงใน 96-well plate จำนวนหลุมละ 10 μ l และเติม ABTS working reagents จำนวน 200 μ l ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มีอุณหภูมิห้อง 7 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

คำนวณปริมาณ % scavenging เทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox ใน Absolute ethanol ที่ระดับความเข้มข้น 400, 200, 100, 50, 25 $\mu\text{g/ml}$ รายงานผลเป็นมิลลิกรัมของโทลอกซ์ต่อกรัมของสารสกัด (mg of Trolox equivalent/ g of extract)

- Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay ดัดแปลงจากวิธีการของ Kubola and Siriamornpun (2008)

นำ Stock solution ของสารสกัดมาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml เตรียม FRAP working reagents โดยผสมสารละลาย (A) เตรียม Sodium acetate trihydrate 77.5 mg และ Glacial acetic acid 1.6 ml ใน DI water ปริมาตร 25 ml ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิห้อง (B) เตรียมสารละลาย TPTZ 15.6 mg ใน HCl 40 mM จำนวน 5 ml ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิห้อง และ (C) เตรียม Ferric chloride (FeCl_3) จำนวน 27.03 ml ใน DI water 5 ml ผสม working reagents ในอัตราส่วนการผสม 10: 1: 1 (A: B: C) ใช้สารละลาย Trolox ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน DI water เป็น blank control

เติมสารทดสอบลงใน 96-well plate จำนวนหลุมละ 20 μl และเติม FRAP working reagents ที่นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 180 μl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มีอุณหภูมิห้อง 8 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

คำนวณปริมาณ % scavenging เทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox ใน Absolute ethanol ที่ระดับความเข้มข้น 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ รายงานผลเป็นมิลลิกรัมของโทลอกซ์ต่อกรัมของสารสกัด (mg of Trolox equivalent/ g of extract)

การทดลองที่ 2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในการปกป้องเซลล์ประสาท SH-SY5Y ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในความเข้มข้นต่าง ๆ และกลุ่มควบคุม

การศึกษานี้ผ่านการพิจารณาความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา รหัสโครงการ IBC 039/2564

เครื่องมือในการศึกษา

1. เซลล์เพาะเลี้ยง
 - เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Human neuroblastoma ; SH-SY5Y cell line ใช้สำหรับศึกษาการเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาท (Kovalevich & Langford, 2013; C. Wang & Slikker Jr, 2017)
2. อาหารเลี้ยงเซลล์
 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
3. สารทดสอบ
 - สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ
 - สาร D-galactose (KemAus™, Australia)
4. วัสดุอุปกรณ์
 - กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) (Invitrogen®, USA)
 - ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture flasks)
 - เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex mixer)
 - เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
 - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ (Centrifuge machine)
 - เครื่องอบลมร้อน (Hot air oven)
 - เครื่องอ่างไอน้ำ (Water bath)
 - เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate reader)
 - ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow hood) (Thermo Scientific, Germany)
 - ตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ชนิดควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ Incubator) (Thermo Scientific, Germany)
 - ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Deep freezer)

- ปิเปต 10 ml (Pipette) (Thermo Scientific, Germany)
- ปิเปตเอ็ด (Pipette aids) (Falcon®,)
- Autoclave
- ออโต้ปิเปต (Autopipette) ขนาด 10-100 μ l, 50-300 μ l (Sartorius, Germany)
- อลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum Foil)
- Centrifuge tube ขนาด 15, 50 ml
- Cell tissue culture dish
- สไลด์นับจำนวนเซลล์ (Hemocytometer)
- 96 well plates

5. สารเคมี

- Bovine Serum Albumin (BSA)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (ACI Labscan, Thailand)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
- Penicillin G/ Streptomycin
- Trypan Blue Stain (PanReac, Spain)
- Trypsin 0.25% (1X) solution with 0.1% EDTA (Gibco, USA)
- Sodium phosphate buffer

วิธีการศึกษา

เตรียมสารสำหรับทดสอบ

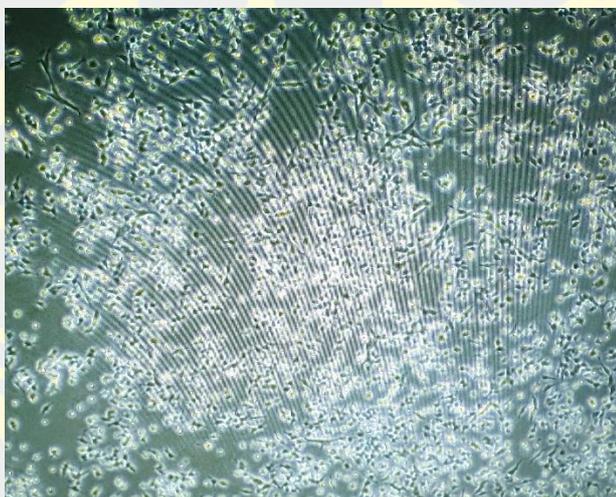
เตรียมสารสกัดคาร์บอนอายุวัฒนะที่ความเข้มข้น 2 mg/ml และสาร D-galactose ที่ความเข้มข้น 800 mM ใน Phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นนำไปกรองด้วย Syringe filters ขนาด 0.2 μ m เก็บสารทดสอบที่ได้ในหลอด microcentrifuges ปิดฝาให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกับ Fetal bovine serum 10% (v/v), Penicillin 100 unit/ml, Streptomycin 100 μ g/ml และ Amphotericin B 25 μ g/ml โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM สำหรับเซลล์ SH-SY5Y cell line จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเซลล์ชนิดควบคุมก๊าซ

คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลา ทำการล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นทำการย่อยเซลล์ด้วย Trypsin-EDTA 0.25% นำไปปั่นที่ CO₂ incubator 5-7 นาที ให้ได้เซลล์แขวนลอย (Cell suspension) ดูดใส่ centrifuge tube ขนาด 15 ml แล้วนำไปปั่นโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที แล้วนำเซลล์ที่ได้ (Cell pellet) มาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS 10% และทำเป็นเซลล์แขวนลอย (แสดงดังภาพที่ 18) นำเซลล์มานับด้วยวิธี trypan blue exclusion method ในสไลด์นับเซลล์ คำนวณหาปริมาณเซลล์ที่จะบรรจุลงใน 96 well plate



ภาพที่ 18 เซลล์ SH-SY5Y cell line; Human neuroblastoma

ทดสอบความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity)

นำเซลล์ SH-SY5Y ที่เพาะเลี้ยงมาบรรจุลงใน 96-well plate ที่ความเข้มข้น 2×10^4 cells/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM นำไปเพาะเลี้ยงต่อที่ CO₂ incubator 48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์มีความหนาแน่น 70-80% ก่อนทำการทดสอบให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก

เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะละลายอยู่ที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 12.5, 25, 50 µg/ml และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร D-galactose ละลายอยู่ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 mM จากนั้นนำไปปั่น CO₂ incubator ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลานำเซลล์ออกมาส่องและตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cell viability) ด้วยวิธี MTT cell proliferation assay ปรึบความเข้มข้นจนกว่าจะได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์เหลือรอด 80% ในสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ และ เหลือรอด 50% ในสาร D-galactose

รายงานผลในรูปของ % Cell viability เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control ที่ได้รับเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีค่า % Cell viability เท่ากับ 100

ทดสอบผลของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะต่อเซลล์ประสาทที่เตรียมสำหรับทดสอบ

นำเซลล์ SH-SY5Y ที่เพาะเลี้ยงมาบรรจุลงใน 96-well plate ที่ความเข้มข้น 2×10^4 cells/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM นำไปเพาะเลี้ยงต่อที่ CO₂ incubator 48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์มีความหนาแน่น 70-80% นำอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก จากนั้นเติมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ในความเข้มข้นที่ผ่านการทดสอบความเป็นพิษแล้วจำนวน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ ต่ำ ปานกลาง สูง หลุมละ 150 μ l นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง ให้กลุ่มควบคุมได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ

เมื่อครบเวลาทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร D-galactose ละลายอยู่ที่ความเข้มข้นเท่ากับ LD₅₀ ลงในทุกหลุมๆ ละ 150 μ l และเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ CO₂ incubator จากนั้นประเมินการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ (Cell viability) ด้วยวิธี MTT cell proliferation assay

การประเมินคุณภาพและการรอดชีวิตของเซลล์

ประเมินการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (Cell morphology)

นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) สังเกตเซลล์ที่มีรูปร่างผิดปกติเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่น ลักษณะบวม หดตัว ฝ่อ เป็นซากเศษเซลล์ปะปนอยู่กับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่

นับจำนวนเซลล์ ด้วยวิธี Trypan blue exclusion method

นำเซลล์เพาะเลี้ยง จำนวน 100 μ l มาผสมกับ 0.4% trypan blue อัตราส่วน 1:1 และนำไปใส่ในสไลด์นับเซลล์ (hemocytometer) ทำการนับจำนวนเซลล์ที่ใสไม่ติดสี (เซลล์ที่มีชีวิต) จากนั้นนำมาคำนวณลง well plate

ตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ด้วยวิธี MTT cell proliferation assay

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลาย MTT (5% w/v) เดิมลงใน 96 well plate ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ (CO₂ incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งให้เหลือเฉพาะผลึกสีม่วงของ formazan salt เดิม 100% DMSO จำนวน 150 μ l เพื่อละลายผลึก Formazan salt ผสมให้เข้ากันได้สารสีม่วง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

คำนวณหาร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) จากสูตร

$$\% \text{ Cell viability} = \left(\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม}} \right) \times 100$$

เปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ได้รับเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีค่า % Cell viability เท่ากับ 100

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (Mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation: SD) ค่าสูงสุด (Max) และค่าต่ำสุด (Min)

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่ม ใช้สถิติ Analysis of variance (ANOVA) กับ Kruskal-Wallis Test

กำหนดค่า $p\text{-value} \leq 0.05$ หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบกับตัวทำลายในความเข้มข้นที่ใช้เตรียมสารทดสอบจะต้องแสดงอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบเกินกว่า $\pm 5\%$ จึงยอมรับว่าตัวทำลายไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์

ระยะที่ 3 การศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI

การศึกษาระยะนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบผลของตำรับยาอายุวัฒนะต่อพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI ด้วยสาร D-galactose ซึ่งเหนี่ยวนำให้หนูแก่และมีความเสียหายที่ระบบการเรียนรู้ และทำการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การศึกษานี้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่อนงานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา รหัสโครงการ IACUC 011/2566

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลอง

การทดลองนี้ศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลอง ด้วยเครื่องมือ Morris water maze บันทึกระยะเวลาที่หนูทดลองว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำ และระยะเวลาที่หนูว่ายวนในโซนที่เคยมีแท่นใต้น้ำ

เครื่องมือในการศึกษา

1. สัตว์ทดลอง
 - หนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR (Imprinting Control Region) เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักตัวเฉลี่ย 35-50 กรัม จำนวน 32 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. อุปกรณ์สำหรับสัตว์ทดลอง
 - กรงเลี้ยงสัตว์
 - ชั่งข้าวโพดอบแห้งปราศจากเชื้อ
 - ผักตบชวาอบแห้งปราศจากเชื้อ
 - อาหารเม็ดจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ รหัส 082G
 - น้ำดื่มสำหรับสัตว์ทดลอง
 - ขวดให้สารน้ำ
 - หัวเข็มป้อนสาร เบอร์ 18 (Gavage tube, 18Gx1/2")
3. สารทดสอบ
 - สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (Anti-aging remedy: AAR)
 - Donepezil (Aricept®, Japan)
 - D-galactose (KemAus™, Australia)
 - น้ำกลั่น

4. สารเคมี

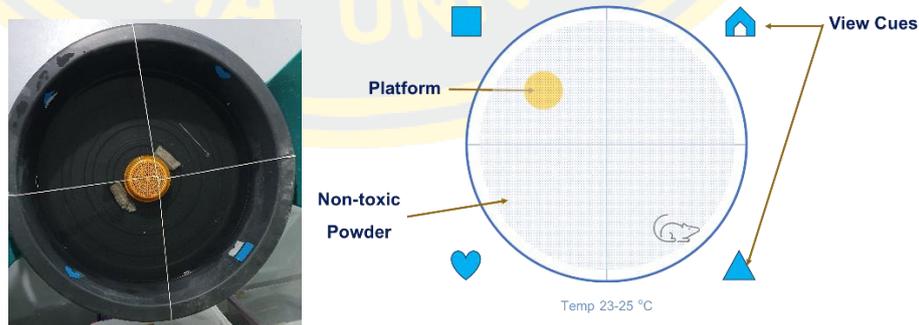
- Xylazine (MEIXYLA®, Thailand)

5. วัสดุอุปกรณ์

- กล้องถ่ายวิดีโอ (Digital video camera) (Olympus, Japan)
- กระบอกเข็มฉีดยา ขนาด 1 ml (Disposable syringe) (NIPRO, Thailand)
- หัวเข็มฉีดยา เบอร์ 27 (Hypodermic needle, 27Gx1/2") (NIPRO, Thailand)
- ถุงมือยางทางการแพทย์ (Examination glove)
- ผงแป้งสีขาวที่ไม่เป็นพิษ (Non-toxic powder)
- เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- ปากกาเขียนทาง (Non-toxic)
- นาฬิกาจับเวลา (Digital timer)
- Microcentrifuge 1.5 ml

6. อุปกรณ์ในการทดสอบพฤติกรรม

Morris water maze test (MWM) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้านทิศทางและสถานที่ (Spatial memory) ประกอบด้วย อ่างทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 เซนติเมตร ความสูงอ่าง 25 เซนติเมตร บรรจุน้ำลึก 20 เซนติเมตร แท่นขึ้นทรงกระบอกสูง 19 เซนติเมตรและมีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 เซนติเมตร โดยอ่างทรงกลมแบ่งออกเป็น 4 บริเวณแต่ละบริเวณมีสัญลักษณ์กำกับไว้ที่ขอบอ่าง (แสดงดังภาพที่ 19) น้ำที่ใช้เป็นน้ำที่มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง (23-25 องศาเซลเซียส) บนผิวน้ำมีการโรยผงแป้งสีขาวที่ไม่เป็นพิษเพื่อป้องกันการมองเห็นแท่นใต้น้ำของหนูทดลอง



ภาพที่ 19 เครื่องมือ Morris water maze (MWM)

วิธีการศึกษา

การเตรียมสัตว์ทดลอง

เมื่อได้รับหนูทดลองจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดลแล้ว ทำการตรวจสอบเพศและชั่งน้ำหนัก แบ่งหนูทดลองเข้ากรงเลี้ยงสัตว์ กรงละ 4 ตัว พักหนูทดลอง 5 วัน เพื่อให้ปรับตัวคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่ โดยหนูทุกตัวจะได้รับการเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง ที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสม มีอากาศถ่ายเท มีการควบคุมแสงสว่างให้เปิด-ปิด 12 ชั่วโมง/วัน (แสดงดังภาพที่ 20) อาหารที่ได้รับเป็นอาหารเม็ดจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มีน้ำสะอาดในปริมาณที่สมบูรณ์ วัสดุรองนอนเป็นขี้ขาวโพดอบแห้งปราศจากเชื้อผสมกับฟักตบขาวอบแห้งปราศจากเชื้อ อัตราส่วน 2:3 ทำการเปลี่ยนทุกๆ 3 วัน



ภาพที่ 20 การพักสัตว์ทดลอง

การฝึกหนูทดลอง

ฝึกเรียนรู้อุปกรณ์ Morris water maze test (MWM)

วันที่ 1 ปล่อยหนูให้ขึ้นบนแท่นที่โผล่เหนือน้ำ เป็นระยะเวลา 15 วินาที เพื่อสร้างความเคยชินและปรับสภาพหนูทดลองให้เข้ากับพื้นที่ทดสอบ (แสดงดังภาพที่ 21) ทำการทดสอบตัวละ 2 ครั้ง เช็ดตัวให้แห้งก่อนนำเข้ากรง

วันที่ 2 ปล่อยหนูลงในอ่างทรงกลมบริเวณจุดที่มีสัญลักษณ์ต่างๆ โดยมีแท่นที่โผล่เหนือน้ำวางอยู่กลางอ่าง ให้เวลาหนูว่ายน้ำหาแท่นกลางอ่างเป็นเวลา 60 วินาที เมื่อหนูหาแท่นเจอจะให้อยู่บนแท่น 10 วินาที (แสดงดังภาพที่ 21) หากตัวใดหาแท่นไม่เจอจะนำทางหนูให้ว่ายน้ำไปหาแท่นให้อยู่บนแท่น 10 วินาที ทำการบันทึกจำนวนเวลาที่หนูหาแท่นเจอ เริ่มบันทึกตั้งแต่ปล่อยหนูลงน้ำจนหนูหาแท่นเจอ (Escape latency; EL) กำหนดเวลาไม่เกิน 60 วินาที (หากเกิน 60 วินาที ให้บันทึกเวลาเป็น 60 วินาที) ทำการฝึกตัวละ 4 ครั้ง เช็ดตัวให้แห้งก่อนนำเข้ากรง

วันที่ 3-7 จำลองการป้อนสาร การพัก และการฉีดยาด้วยปากกาในหนูทุกตัว เพื่อสร้างความเคยชิน การเรียนรู้อุปกรณ์ Morris water maze test (MWM) ทำเช่นเดียวกับวันที่ 2 แต่ปรับเปลี่ยนตำแหน่งการวางแท่นให้อยู่ในบริเวณใดบริเวณหนึ่ง โดยให้แท่นอยู่ใต้น้ำและทำการโรยผงแป้งเพื่อบังสายตา (แสดงดังภาพที่ 21) เริ่มบันทึกเวลาตั้งแต่ปล่อยหนูลงน้ำจนหนูหาแท่นใต้น้ำเจอ (Escape latency; EL) ทำการฝึกตัวละ 4 ครั้ง/วัน เช็ดตัวให้แห้งก่อนนำเข้ากรง



ภาพที่ 21 การฝึกหนูทดลอง วันที่ 1 และวันที่ 3-7

การแบ่งกลุ่มหนูทดลอง

ทำการแบ่งกลุ่มหนูทดลอง โดยการนำค่าเฉลี่ยของ (Escape latency; EL) ในการฝึกวันที่ 3-7 มาแบ่งกลุ่ม โดยกำหนดให้แต่ละกลุ่มมีค่า Escape latency ที่ใกล้เคียงกัน แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (Naïve control)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุม (Control) เป็นกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยสาร D-galactose ขนาด 200 mg/kg BW, (s.c.) และ น้ำกลั่น (p.o.)

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดสอบ (Treatment) เป็นกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยสาร D-galactose ขนาด 200 mg/kg BW, (s.c.) และ สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ ขนาด 500 mg/kg BW (p.o.)

กลุ่มที่ 4 กลุ่มที่ได้รับยาที่มีฤทธิ์ในการเพิ่มการเรียนรู้และความจำ (Positive control) เป็นกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยสาร D-galactose ขนาด 200 mg/kg BW, (s.c.) และ Donepezil ขนาด 3 mg/kg BW (p.o.)

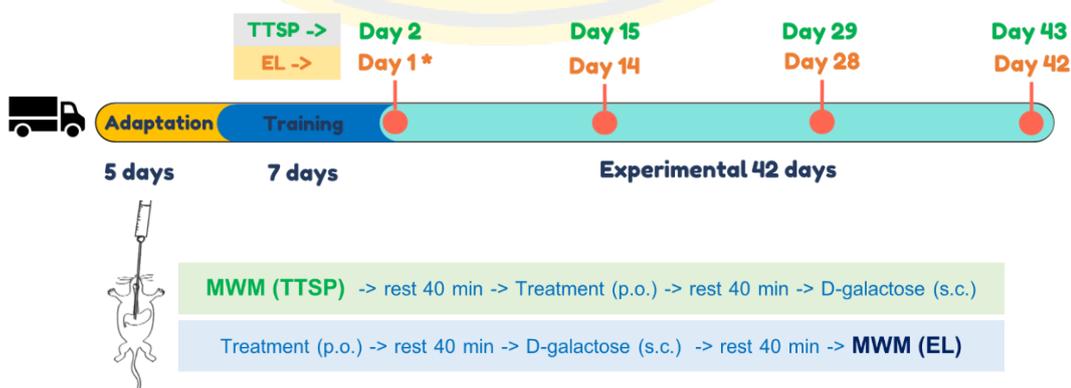
การป้อนสารทดสอบ

ทำการป้อนสารทดสอบด้วยวิธี Oral gavage (p.o.) ตามกลุ่มที่กำหนดไว้ในปริมาณดังนี้ น้ำกลั่นและ Donepezil ขนาด 3 mg/kg BW ปริมาตร ≤ 0.2 ml สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ ขนาด 500 mg/kg BW ปริมาตร ≤ 0.1 ml โดยนับวันที่ป้อนสารวันที่ 1 เป็น single dose หลังป้อนสารทำการพักหนูทดลอง 40 นาที หลังจากนั้นทำการฉีดสาร D-galactose ขนาด 200 mg/kg BW ปริมาตร ≤ 0.4 ml เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอ (s.c.) (Lalert, Maneesri le-Grand, Techarang, Huntula, & Punsawad, 2022) ในหนูทดลองกลุ่มที่ 2-4 ระยะเวลาการป้อนสารทดสอบติดต่อกันทั้งหมด 42 วัน (6 สัปดาห์)

การทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze (MWM)

ทำการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้านทิศทางและสถานที่ (Spatial memory) ในวันที่ 1 (Single dose), วันที่ 14, วันที่ 28 และวันที่ 42 หลังจากป้อนสารทดสอบ (Water; AAR; Donepezil) และฉีดสารเหนี่ยวนำ (D-galactose) พักเป็นระยะเวลา 40 นาที ปล่อยหนูลงในอ่างทรงกลมบริเวณจุดที่มีสัญลักษณ์ต่างๆ โดยมีแท่นได้น้ำวางอยู่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง ropyong เพื่อบังสายตา บันทึกเวลาตั้งแต่ปล่อยหนูลงน้ำจนหนูหาแท่นเจอ (Escape latency: EL) เช็ดตัวให้แห้งก่อนนำเข้กรง

ทำการทดสอบความจำเรียกคืน (Retention time) ในวันที่ 2, วันที่ 15, วันที่ 29 และวันที่ 43 ด้วย MWM โดยนำแท่นได้น้ำออกและ ropyong เพื่อบังสายตา ปล่อยหนูลงในบริเวณต่างๆ ที่มีจุดสัญลักษณ์ บันทึกเวลารวมที่หนูว่ายวนในโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำอยู่ (Total time spent in platform: TTSP) เช็ดตัวให้แห้งก่อนนำไปพัก 40 นาที จากนั้นนำมาป้อนสารทดสอบและฉีดสารเหนี่ยวนำ แผนผังแสดงดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 แผนการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze (MWM)

การกำจัดหนูทดลองเมื่อสิ้นสุดการศึกษาพฤติกรรม

ในวันที่ 43 เมื่อทำการทดสอบความจำเรียกคืน (Retention time) เสร็จแล้ว หนูทดลองจะถูกพักและทำการการุณยฆาต (Euthanasia) ด้วยการให้ยาสลบแบบเกินขนาด (Overdose) โดยการใช้ยา Xylazine ขนาด 50 mg/kg BW ปริมาตร 0.4 ml เข้าที่ช่องท้อง (i.p.) เมื่อหนูสลบแล้วจึงนำมาตรวจสอบการเสียชีวิต ด้วยการทดสอบความเจ็บปวด (Areflexia) ก่อนนำไปผ่าเปิดกะโหลกเพื่อเก็บสมอง ด้วยการเลาะหนังและเนื้อเยื่อออกจากบริเวณกะโหลก และใช้กรรไกรบิดแยกกะโหลกออกจากกัน กีบแผ่นกะโหลกออกจะเห็นสมองหนู และทำการตรวจสอบเนื้อสมอง ก่อนนำอวัยวะไปทำการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของแต่ละกลุ่มและแต่ละช่วงเวลาโดยใช้สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสูงสุด และค่าต่ำสุด

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่มโดยใช้ Kruskal Wallis Test และ Mann Whitney U test

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่มโดยใช้ Friedman Test และ Wilcoxon Signed Ranks Test

กำหนดค่า $p\text{-value} \leq .05$ หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองที่ 3.2 การตรวจสอบการตายของเซลล์ประสาทและตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิด MCI ในหนูทดลอง

การทดลองนี้นำสมองหนูออกมาทำการตรวจสอบเพื่อประเมินความหนาแน่นของเซลล์ประสาท และประเมินกลไกการออกฤทธิ์ผ่านตัวชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarkers) ที่มีความสำคัญในกลไก

เครื่องมือในการทดลอง

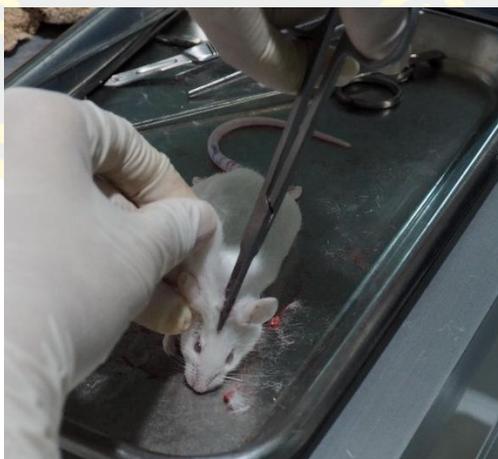
1. สารเคมี
 - 1.1 ดอง
 - PBS (Phosphate buffered saline)
 - 10% formalin
 - 1.2 Homogenize
 - Ice-cold phosphate buffer saline pH 7.4
 - Absolute alcohol
 - 1.3 TBARS assay
 - Thiobabituric acid (TBA)
 - HCl
 - Malondialdehyde (MDA)
 - Trichloroacetic acid (TCA)
 - 1.4 SOD
 - SOD colorimetry kit (Abcam, Cambridge, UK)
2. วัสดุอุปกรณ์
 - ปิเปต ทิป (Pipette tips) ขนาด 200, 1,000 μ l
 - ออโต้ปิเปต (Auto pipettes) ขนาด 1-10, 20-200, 100-1000 μ l
 - หลอดเซนติฟิวก์ (Centrifuge tubes) ขนาด 15, 50 ml (Costar Corning, USA)
 - หลอดไมโครทิวป์ (Microcentrifuge tubes) ขนาด 1.5 ml (Costar Corning, USA)
 - เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ (Schott Duran, Germany; Pyrex, USA)
 - ปากคีบสแตนเลส (Forceps)
 - กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
 - เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge)

- Homogenizer Pestle (for microtubes)
- อลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foils)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
- เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex mixer)
- เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลต (Microplate reader)
- พาราฟิล์ม (Parafilm M) (Bemis®, USA)
- 96-well plate flat
- ถุงมือทางการแพทย์ (Examination glove) (Sritrang gloves, Thailand)
- เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex mixer)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Freezer, -20 C)
- State micrometers (Hulley®, China)
- Eyepiece Micrometers (Hulley®, China)

วิธีการศึกษา

การเก็บสมองหนูทดลอง

ทำการผ่าเปิดกะโหลกหนูทดลอง (แสดงดังภาพที่ 23) นำสมองทั้งหมดออกมาแช่ในน้ำแข็งบดละเอียดทันที นำสมองหนูล้างด้วย Ice-cold phosphate buffer saline pH 7.4 นำมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นแยกสมองซีกซ้ายและซีกขวาออกจากกัน ชั่งน้ำหนักสมองแต่ละซีก จดบันทึก



ภาพที่ 23 การเก็บสมองหนูทดลอง

นำสมองซีกซ้ายมา Fixed ใน 10% Neutral buffered formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ ส่งไปทำสไลด์ที่สำนักสัต์ว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล โดยทำการผ่าสมองแบบ cross-section ให้ได้ส่วนของสมองบริเวณ ซีรีบรัลคอร์เทกซ์ (Cerebral cortex), ซีรีเบลลัม (Cerebellum) และฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) ย้อมสีขึ้นเนื้อด้วย Hematoxylin-Eosin Stain (H&E stain)

นำสมองซีกขวามาบดละเอียดใน Phosphate buffer (pH 7.4) จำนวน 5 เท่าของน้ำหนักสมอง โดยใช้ homogenizer pestle นำ homogenate ที่ได้ใส่ใน microtube นำไปปั่นต่อที่ 5,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (Supernatant) ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสทันที จนกว่าจะนำไปทดลอง

การนับจำนวนเซลล์ประสาท

นำสมองซีกซ้ายที่ได้รับการทำสไลด์ และย้อมด้วย H&E มาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) โดยประเมินเซลล์ประสาทที่มีลักษณะฝ่อเล็กลง (shrunken) และติดสีเข้ม (dark staining) โดยนับจำนวนต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ด้วย micrometers หาค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม ตัวอย่างสไลด์แสดงดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 สไลด์เซลล์สมองหนูทดลองที่ย้อมด้วย H&E

การวิเคราะห์ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) ในเซลล์สมองหนู

การวิเคราะห์ *Lipid peroxidation*

เป็นการตรวจสอบปริมาณของ Malondialdehyde (MDA) ในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐาน MDA (Malondialdehyde) ด้วย TBARS assay

โดยนำสมองที่ทำกร Homogenate จำนวน 70 μ l เติม 10% Trichloroacetic acid (TCA) จำนวน 180 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 6,000 rpm นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อโปรตีนตกตะกอน ทำการดูดส่วนใส (supernatant) จำนวน 180 μ l ผสมกับ 0.6% Thiobabituric acid (TBA) จำนวน 360 μ l และ 0.44M phosphoric acid จำนวน 540 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 532 nm

คำนวณหาค่าปริมาณ MDA จากสูตร

$$\text{MDA } (\mu\text{M}/\text{mg protein}) = \frac{\text{ปริมาณ MDA } (\mu\text{M})}{\text{ปริมาณความเข้มข้น โปรตีน} \times 10^{-3} \text{ (mg)}}$$

เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย MDA ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ รายงานผลเป็นค่าไมโครกรัมต่อกรัม โปรตีน ($\mu\text{g}/\text{g protein}$)

การวิเคราะห์ *Superoxide dismutase (SOD) activity*

เป็นการตรวจสอบปริมาณของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในสารตัวอย่างด้วยชุดสกัด SOD colorimetry kit (Abcam, Cambridge, UK) โดยปีเปิดตัวอย่างจำนวน 20 μ l ใน microcentrifuge tube เติม cleavage of tetrazolium salt (WST) working solution จำนวน 200 μ l และ SOD enzyme solution จำนวน 20 μ l ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 nm เปรียบเทียบกับ blank และคำนวณเป็น % SOD activity

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย, ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสูงสุด และค่าต่ำสุด

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบผลของความแตกต่างในแต่ละกลุ่ม โดยใช้ Analysis of variance (ANOVA)

กำหนดค่า $p \leq 0.05$ หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การกำหนดหยุดทดลองเมื่อสิ้นสุดการศึกษา

นำซากหนูที่ถูกกำจัดไว้ในถุงปิดมิดชิด นำไปแช่ช่องแข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และส่งไปกำจัดซากด้วยการเผาด้วยเตาเผาความร้อนสูง



บทที่ 4

ผลการศึกษา

ระยะที่ 1 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยาอายุวัฒนะผ่านโครงข่ายทางเภสัชวิทยา (Network pharmacology; NP)

โครงสร้างสารประกอบของเครื่องยา

ทำการสืบค้นโครงสร้างสารประกอบ (Natural compounds) ของเครื่องยาอายุวัฒนะ 6 ชนิด โดยใช้ชื่อทางพฤกษศาสตร์ในการค้นหาสารประกอบ จากฐานข้อมูล NPASS และ Dr.Duke's ร่วมกับตำรามาตรฐานสมุนไพรไทย (THP) ในแต่ละฐานข้อมูลใช้เกณฑ์พิจารณาสารประกอบดังนี้

- NPASS เลือกโครงสร้างที่มีตั้งแต่ 10 targets หรือ 10 activities ขึ้นไป
- Dr.Duke's เลือกโครงสร้างที่ปรากฏข้อมูล activities และเลือก Exclude Ubiquitous Chemicals
- ตำรามาตรฐานสมุนไพรไทย (THP) และการทบทวนวรรณกรรม เลือกข้อมูลจากสารออกฤทธิ์

ตารางที่ 6 จำนวนโครงสร้างสารประกอบจากเครื่องยาแต่ละชนิดที่ได้จากฐานข้อมูล

เครื่องยา	ตัวย่อ	คำค้นหา	สารประกอบ (โครงสร้าง)
เปลือกทึงถ่อน	AP	<i>Albizia procera</i>	26
เปลือกตะโกนา	DR	<i>Diospyros rhodcoalyx</i>	11
บอระเพ็ด	TC	<i>Tinospora crispa</i>	19
หัวหญ้าแห้วหมู	CR	<i>Cyperus rotundus</i>	77
เมล็ดข่อย	SA	<i>Streblus asper</i>	19
เมล็ดพริกไทยดำ	PN	<i>Piper nigrum</i>	148

เครื่องยาที่พบสารประกอบมากที่สุดจากฐานข้อมูล คือ เมล็ดพริกไทยดำ (*Piper nigrum* L., AP) จำนวน 148 โครงสร้าง รองลงมาคือ หัวหญ้าแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.; CR), เปลือกทึงถ่อน (*Albizia procera* (Roxb.) Benth.; AP), บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Hook. f. &

Thomson; TC), เมล็ดข่อย (*Streblus asper* Lour.; SA) และ เปลือกตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx* Kurz; DR) จำนวน 77, 26, 19, 19, 11 โครงสร้าง ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 6

โครงสร้างที่เหมาะสมในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

พิจารณาจากลักษณะทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic properties) ผ่านฐานข้อมูล NPASS ซึ่งมีการตรวจสอบความถูกต้องและทำนายข้อมูลผ่าน ADMETlab2.0 (Xiong et al., 2021) มีค่าพิจารณาตามหัวข้อดังนี้

1. $F_{30\%}$ 0.0-0.7 (Excellent - Medium): The human oral bioavailability (OB) 30%
2. Caco-2 Permeability > -5.15 (Excellent): the human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2)
3. QED > 0.67 (Excellent): 8 Drug-Likeness (DL) properties
4. Lipinski rule = A (Accept): Lipinski's rule (LR) of five

ผลพบว่า โครงสร้างสารประกอบในตำรับยาอายุวัฒนะที่ผ่านการพิจารณาคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ มีจำนวน 202 โครงสร้าง (ดังตารางที่ 7) ประกอบด้วย เมล็ดพริกไทยดำ (PN) จำนวน 125 โครงสร้าง ถัดมาคือ หัวหญ้าแห้วหมู (CR), เปลือกทึงถ่อน (AP), เมล็ดข่อย (SA), บอระเพ็ด (TC) และเปลือกตะโกนา (DR) จำนวน 46, 17, 7, 4, 3 โครงสร้าง ตามลำดับ ตารางที่ 7 จำนวนสารประกอบที่ผ่านการพิจารณาคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์

เครื่องยา	ชื่อวิทยาศาสตร์	ตัวย่อ	สารประกอบ (โครงสร้าง)
เปลือกทึงถ่อน	<i>Albizia procera</i> (Roxb.) Benth.	AP	17
เปลือกตะโกนา	<i>Diospyros rhodocalyx</i> Kurz	DR	3
บอระเพ็ด	<i>Tinospora crispa</i> (L.) Hook. f. & Thomson	TC	4
หัวหญ้าแห้วหมู	<i>Cyperus rotundus</i> L.	CR	46
เมล็ดย่อย	<i>Streblus asper</i> Lour.	SA	7
เมล็ดพริกไทยดำ	<i>Piper nigrum</i> L.	PN	125
รวม			202

นำสารประกอบที่ผ่านการพิจารณาสร้าง Venn Diagram พบสารประกอบมีโครงสร้างซ้ำกันจำนวน 24 โครงสร้าง เหลือสารประกอบทั้งหมด 178 โครงสร้าง ประกอบด้วย เมล็ดพริกไทยดำ (PN) จำนวน 104 โครงสร้าง รองลงมาคือ หัวหญ้าแห้วหมู (CR), เปลือกทึงถ่อน (AP), เมล็ดข่อย

(SA) เปลือกตะโกนา (DR) และ บอระเพ็ด (TC) จำนวน 23, 16, 6, 4, 1 โครงสร้าง ตามลำดับ เครื่องยาที่มีสารประกอบร่วมกัน ประกอบด้วยเครื่องยา PN และ CR เหมือนกันจำนวน 21 โครงสร้าง เครื่องยา CR และ DR เหมือนกันจำนวน 2 โครงสร้าง เครื่องยา AP และ SA เหมือนกันจำนวน 2 โครงสร้าง สรุปได้ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนสารประกอบเครื่องยาที่คงเหลือ

เครื่องยา	ตัวย่อ	สารประกอบ (โครงสร้าง)
เปลือกทึงถ่อน, เมล็ดข่อย	AP, SA	1
หัวหญ้าเห่าหมู, เปลือกตะโกนา	CR, DR	2
หัวหญ้าเห่าหมู, เมล็ดพริกไทยดำ	CR, PN	21
เปลือกทึงถ่อน	AP	16
หัวหญ้าเห่าหมู	CR	23
เปลือกตะโกนา	DR	1
เมล็ดยี่งอ	PN	104
เมล็ดยี่งอ	SA	6
บอระเพ็ด	TC	4
รวม		178

โปรตีนเป้าหมายของสารประกอบเครื่องยา

ค้นหาโปรตีนเป้าหมาย (Protein targets) ของสารประกอบจากฐานข้อมูล SwissTargetPrediction เลือกเป้าหมายที่มีค่า Probability มากกว่า 0 (หมายถึง โปรตีนเป้าหมายนี้มีข้อมูลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพร่วมกับ โปรตีนเป้าหมายที่แสดง)

ผลพบว่า สารประกอบทั้งหมด 178 โครงสร้าง มีโปรตีนเป้าหมายทั้งหมดจำนวน 1,020 ตัว โปรตีนเป้าหมายที่สามารถพบได้ในสารประกอบของเครื่องยาทั้ง 6 ชนิด มีทั้งหมด 10 ตัว สรุปได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 จำนวนโปรตีนเป้าหมายของสารประกอบในเครื่องยาอายุวัฒนะ

สารประกอบในเครื่องยา	Genes (ตัว)	สารประกอบในเครื่องยา	Genes (ตัว)
AP, CR, DR, PN, SA, TC	10	DR, PN	2
AP, DR, PN, SA, TC	4	CR, DR	1
AP, CR, DR, PN, TC	2	AP, PN	38
AP, CR, DR, PN, SA	8	AP, SA	20
CR, DR, PN, SA, TC	1	AP, CR	4
AP, CR, PN, SA, TC	26	PN, TC	17
AP, DR, PN, SA	7	PN, SA	58
AP, CR, DR, PN	5	CR, PN	99
CR, DR, PN, SA	5	DR	1
AP, PN, SA, TC	18	AP	25
AP, CR, PN, TC	11	TC	1
AP, CR, PN, SA	35	PN	431
CR, PN, SA, TC	4	SA	26
CR, DR, PN	22	CR	12
AP, PN, TC	15	รวม	1,020
AP, PN, SA	58		
AP, CR, PN	19		
PN, SA, TC	3		
CR, PN, TC	6		
CR, PN, SA	26		

โปรตีนเป้าหมายที่เหมือนกันในเครื่องยาทั้ง 6 ชนิด มีจำนวน 10 ตัว ดังนี้ ALOX12, BACE1, CA4, CA2, ALOX15, CYP19A1, ESR1, CA6, AR และ ESR2

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรค

ค้นหาโปรตีนเป้าหมาย (Protein targets) ที่เกี่ยวข้องกับไคการเกิด MCI จากฐานข้อมูล DisGeNET ผลพบว่า มีโปรตีนเป้าหมายของสารประกอบมีความเกี่ยวข้องกับโรคทั้งหมด 118 ตัว

โดยมี Mild cognitive impairment (MCI) จำนวน 82 ตัว Cognitive deterioration (CD) และ Age-related cognitive decline (ARCD) อย่างละ 5 ตัว ที่เหลือเป็นโปรตีนเป้าหมายที่มีซ้ำในหลายโรค จำนวน 13 ตัว สรุปได้ดังตารางที่ 10

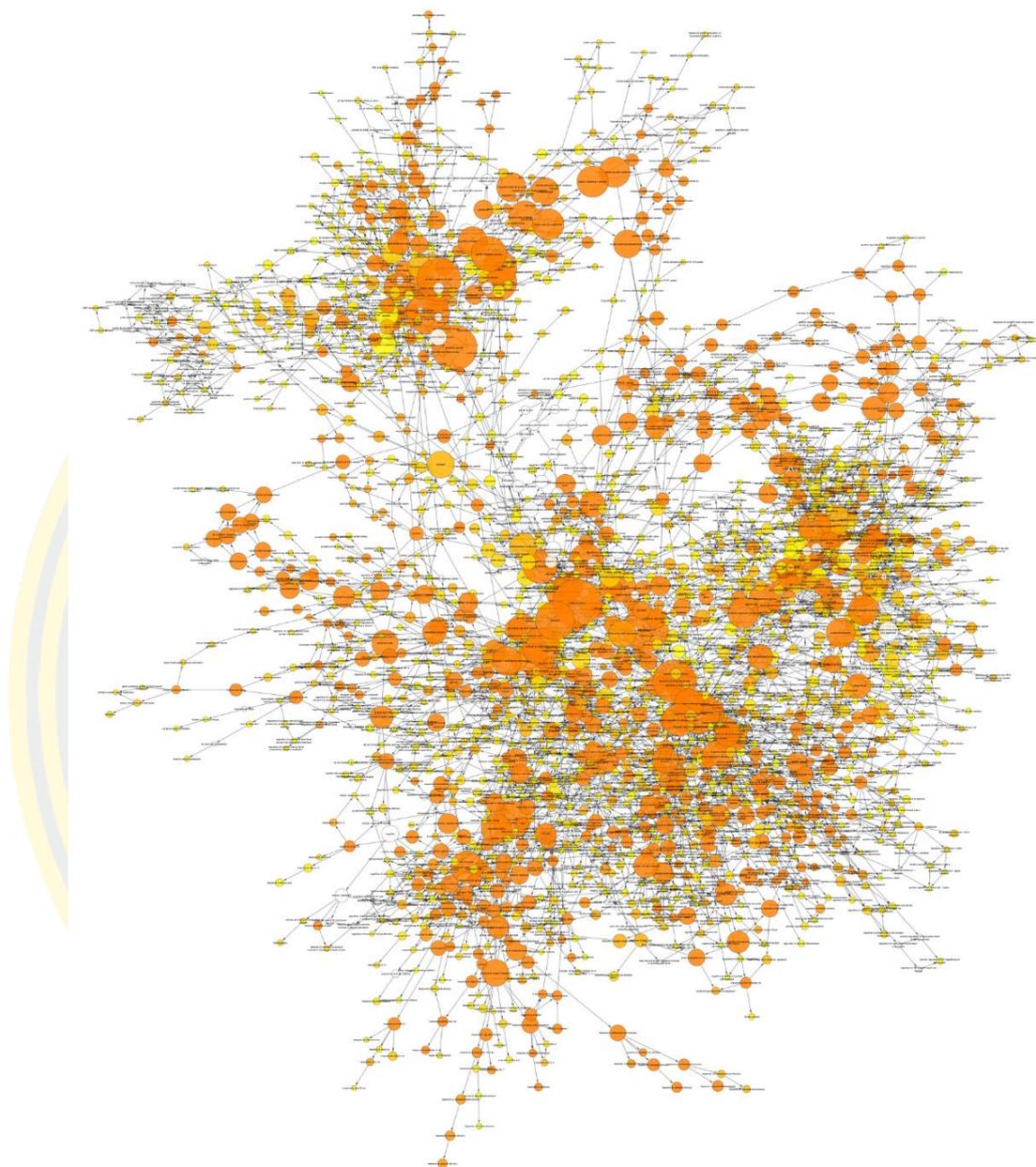
ตารางที่ 10 จำนวนโปรตีนเป้าหมายของสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับโรค

โรค	ตัวย่อ	Genes (ตัว)
Mild cognitive impairment	MCI	
Age-related cognitive decline	ARCD	13
Cognitive deterioration	CD	
Mild cognitive impairment	MCI	8
Cognitive deterioration	CD	
Mild cognitive impairment	MCI	4
Age-related cognitive decline	ARCD	
Mild cognitive impairment	MCI	82
Cognitive deterioration	CD	5
Age-related cognitive decline	ARCD	5
รวม		118

โปรตีนเป้าหมายที่เหมือนกันในโรค มีจำนวน 13 ตัว ดังนี้ APP, ACE, ALB, ACHE, BCHE, VCAM1, IL6, PSEN1, COMT, ESR2, SIRT1, ESR1 และ HDAC3

โครงข่ายทางเภสัชวิทยาและการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเชื่อมปฏิสัมพันธ์ด้วย Advanced network merge และทำการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ด้วย Network analyzer ผลที่ได้ดังภาพที่ 25



ภาพที่ 25 โครงข่ายของคำรับยาอายุวัฒนะ (Network pharmacology)

เมื่อทำการวิเคราะห์โครงข่าย พบว่ามีโหนด (Nodes) ทั้งหมด 1,208 โหนด มีปฏิสัมพันธ์ (Edges) เกิดขึ้นทั้งหมด 7,203 ปฏิสัมพันธ์ เส้นผ่านศูนย์กลางของโครงข่าย (Network diameter) เท่ากับ 6 รัศมีของโครงข่าย (Network radius) เท่ากับ 4 ความยาวเส้นทางลักษณะเฉพาะ (Characteristic path length) หรือเรียกว่าความยาวเส้นทางที่สั้นที่สุดโดยเฉลี่ย (The average shortest path length) เป็นระยะทางที่คาดหวังระหว่างโหนดที่เชื่อมต่อกัน มีค่าเท่ากับ 3.407 จำนวนเพื่อนบ้านโดยเฉลี่ย (Average number of neighbors) บ่งบอกถึงการเชื่อมต่อโดยเฉลี่ยของโหนดใน

โครงข่าย มีค่าเท่ากับ 11.925 ค่าสัมประสิทธิ์การจัดกลุ่มสำหรับโหนดทั้งหมดในเครือข่าย (Clustering coefficient) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0 แสดงถึงความใกล้ชิดของโหนดที่จะเป็นกลุ่ม (เชื่อมต่ออย่างเต็มที่) ความหนาแน่นของโครงข่าย (Network density) เท่ากับ 0.010 เมื่อเทียบกับโครงข่ายที่มีความหนาแน่นมากจะมีค่า Network density = 1 ความแตกต่างของเครือข่าย (Network heterogeneity) แสดงแนวโน้มของเครือข่ายที่จะประกอบด้วยจุดรวมโหนด (Hub nodes) มีค่าเท่ากับ 1.649 การรวมศูนย์ของโครงข่าย (Network centralization) เท่ากับ 0.095 โดยโครงข่ายที่มีการกระจายอำนาจจะมีลักษณะของการรวมศูนย์ที่ใกล้เคียงกับ 0 โหนดทั้งหมดที่เชื่อมต่อแบบคู่จะก่อตัวเป็นส่วนประกอบที่เชื่อมต่อ (Connected components) 1 จำนวนส่วนประกอบที่เชื่อมต่อบ่งชี้ถึงการเชื่อมต่อของเครือข่าย – จำนวนส่วนประกอบที่เชื่อมต่อน้อยกว่าแสดงว่ามีการเชื่อมต่อที่แรงกว่า

โปรตีนเป้าหมายที่มีค่า degree 10 อันดับแรก ได้แก่ GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) = 66.0, SRC (SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase) = 64.0, TP53 (tumor protein p53) = 59.0, MAPK1 (mitogen-activated protein kinase 1) = 51.0, ESR1 (estrogen receptor 1) = 48.0, PRKCA (protein kinase C alpha) = 48.0, STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) = 48.0, PIK3R1 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1) = 46.0, FYN (FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase) = 44.0 และ AKT1 (AKT serine/threonine kinase 1) = 42.0 แต่ละยีนสามารถเชื่อมโยงกับสารประกอบได้ดังตารางที่ 11 ตารางที่ 11 โปรตีนเป้าหมายที่เชื่อมต่อกับโครงสร้างสารประกอบในตำรับยาอายุวัฒนะ

Name	Compounds	Herbs
AKT1	(R)-Verapamil	PN
(Serine/threonine-protein kinase AKT)	7-(Benzo[D][1,3]Dioxol-5-Yl)-1-(Piperidin-1-Yl)Hepta-2,4,6-Trien-1-One	PN
	Apigenin	TC
	Chrysoeriol	TC
	Esculetin	CR
	Kaempferol	PN
	Luteolin	TC
	Magnolol	SA
	MYRISTICIN	PN

Name	Compounds	Herbs
	Obovatol	SA
	Rhamnetin	PN
	Sid14730841	PN
	Sid14737105	PN
	Vitamin E	PN
ESR1 (Estrogen receptor alpha)	(1S,3R,4S)-4,7,7- Trimethylbicyclo[2.2.1]Heptan-3-Ol	CR
	(1S,5S)-4,6,6- Trimethylbicyclo[3.1.1]Hept-3-Ene	CR
	(2R)-6-Methyl-2-[(1R)-4- Methylcyclohex-3-En-1-Yl]Hept-5- En-2-Ol	PN
	(3R,4As,5R)-4A,5-Dimethyl-3-Prop- 1-En-2-Yl-2,3,4,5,6,7-Hexahydro-1H- Naphthalene	CR
	(4As,7R)-1,4A-Dimethyl-7-Prop-1- En-2-Yl-3,4,5,6,7,8-Hexahydro-2H- Naphthalen-2-Ol	CR
	(R)-Pinocembrin	PN
	1R-(+)-Alpha-Pinene	CR/ PN
	2-(4-Methylcyclohex-3-En-1- Yl)Propan-2-Ol	CR/ PN
	3Alpha-Hydroxy-Cyperone	CR
	Alpha-Bisabolol	PN
	Alpha-Pinene	CR/ PN
	Alpha-Terpineol	CR/ PN
	Apigenin	TC
	Beta-Eudesmol	PN
	Beta-Sitosterol	CR/ DR

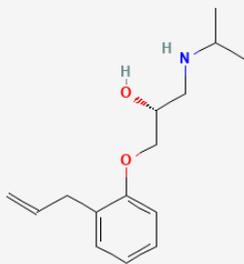
Name	Compounds	Herbs
	Borneol	CR/ PN
	Caffeic Acid	PN
	Carene	PN
	Chrysoeriol	TC
	Citronellol	PN
	Coumaric Acid	AP
	DL-3-(4-Hydroxyphenyl)Alanine	PN
	Esculetin	CR
	Ethinyl Estradiol	PN
	Fenchyl Alcohol	CR
	Genistein	AP
	Isolariciresinol	SA
	Kaempferol	PN
	Linoleic Acid	PN
	Luteolin	TC
	Nootkatone	CR
	P-COUMARIC-ACID	PN
	Retinol	PN
	Sarmentine	PN
	Stigmasterol	CR/DR
	Terpineol	CR/ PN
	Vitamin E	PN
FYN	(R)-Verapamil	PN
(Tyrosine-protein kinase FYN)	(S)-Verapamil	PN
	4,5-Dihydropiperlonguminine	PN
	Bamipine	PN
	Caffeic Acid	PN
	DL-3-(4-Hydroxyphenyl)Alanine	PN

Name	Compounds	Herbs
	Ethinyl Estradiol	PN
	Ferulic Acid	AP
	Methionine	PN
	Pellitorin	PN
	Piperidine	PN
	(E)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-cyclopentylprop-2-enamide	PN
	Tamsulosin	PN
	Vanillic Acid	AP
GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2)	DL-3-(4-Hydroxyphenyl)Alanine	PN
	Thiamine	PN
MAPK1 (MAP kinase ERK2)	Caffeic Acid	PN
	Dehydroconiferyl Alcohol	AP
	Dihydrodehydroconifery Alcohol	AP/ SA
	Dodecanoate	PN
	Isolariciresinol	SA
	Isomagnolol	SA
	Linoleic Acid	PN
	Palmitic Acid	CR/ PN
	Piperettine	PN
	Retinol	PN
	Tamsulosin	PN
PIK3R1 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1)	Apigenin	TC
	Chrysoeriol	TC
	Kaempferol	PN
	Luteolin	TC
	Rhamnetin	PN
	Dehydroconiferyl Alcohol	AP

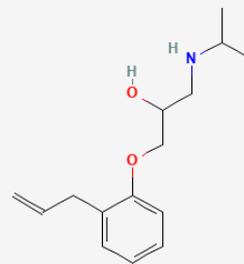
Name	Compounds	Herbs
	Dihydrodehydrodiconifery Alcohol	AP/ SA
	Isolariciresinol	SA
PRKCA (Protein kinase C alpha)	3,7,11-Trimethyldodeca-1,6,10-Trien-3-Ol	PN
	Carvacrol	PN
	Dehydroconiferyl Alcohol	AP
	Randaol	SA
	Sid14730841	PN
	(E)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-cyclopentylprop-2-enamide	PN
	Tamsulosin	PN
	Trans-Phytol	CR
SRC (Tyrosine-protein kinase SRC)	(2R)-1-(Propan-2-Ylamino)-3-(2-Prop-2-Enylphenoxy)Propan-2-Ol	PN
	(2Z,4Z)-5-(1,3-Benzodioxol-5-Yl)-1-Piperidin-1-Ylpenta-2,4-Dien-1-One	PN
	(R)-Pinocembrin	PN
	(R)-Verapamil	PN
	(S)-Verapamil	PN
	4,5-Dihydropiperlonguminine	PN
	7-(Benzo[D][1,3]Dioxol-5-Yl)-1-(Piperidin-1-Yl)Hepta-2,4,6-Trien-1-One	PN
	Alprenolol	PN
	Apigenin	TC
	Chrysoeriol	TC
	Dihydrodehydrodiconifery Alcohol	AP/ SA
	Esculetin	CR
	Ethinyl Estradiol	PN

Name	Compounds	Herbs
	Eugenol	PN
	Isolariciresinol	SA
	Kaempferol	PN
	Luteolin	TC
	PAZJSJFMUHDSTF- AWEZLNQCLSA-N	PN
	Piperanine	PN
	Piperettine	PN
	Piperine	PN
	Piplartine	PN
	Randaiol	SA
	Rhamnetin	PN
	Tamsulosin	PN
TP53 (Tumor suppressor p53/oncoprotein Mdm2)	Sandaracopimaric Acid	PN

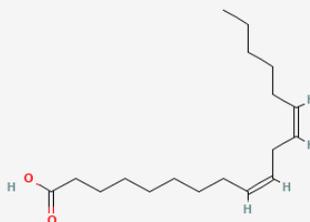
สารประกอบที่มีค่า degree สูงสุด 10 อันดับ ได้แก่ (2R)-1-(Propan-2-Ylamino)-3-(2-Prop-2-Enylphenoxy)Propan-2-Ol = 112, Alprenolol = 112, Linoleic Acid = 109, (S)-Verapamil = 108, (2Z,4Z)-5-(1,3-Benzodioxol-5-Yl)-1-Piperidin-1-Ylpenta-2,4-Dien-1-One = 108, (R)-Verapamil = 107, (S)-Alprenolol = 107, Piplartine = 107, Magnolol = 106 และ Obovatol = 106 แสดงโครงสร้างของสารประกอบดังภาพที่ 26



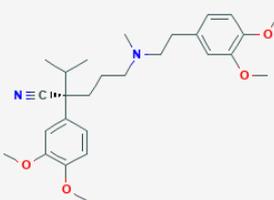
(2R)-1-(Propan-2-ylamino)-3-(2-Prop-2-Enylphenoxy)Propan-2-Ol



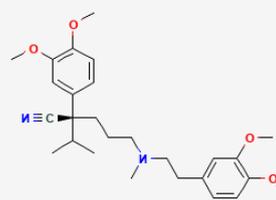
Alprenolol



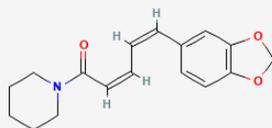
Linoleic Acid



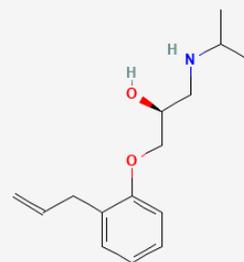
(S)-Verapamil



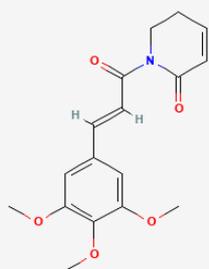
(R)-Verapamil



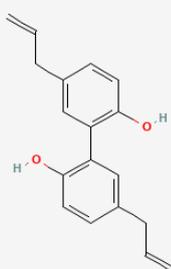
(2Z,4Z)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-1-Piperidin-1-ylpenta-2,4-Dien-1-One



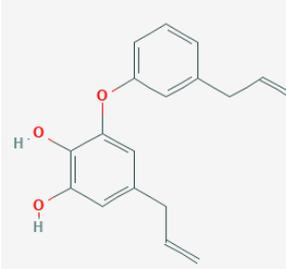
(S)-Alprenolol



Piplartine



Magnolol



Obovatol

ภาพที่ 26 โครงสร้างสารประกอบที่มีคีกรีสสูงที่สุด 10 อันดับ

วิธีที่มีนัยสำคัญจากเครือข่ายปฏิสัมพันธ์

เมื่อทำการวิเคราะห์ KEGG pathway ผ่านปลั๊กอิน JEPETTO ผลพบว่ามีค่า XD-score สูงสุดอยู่ที่ 2.058 ค่า q-value < 0.05 ค่า threshold value ของ XD-score ในการศึกษาี้เท่ากับ 0.67 สรุปได้ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 วิธีที่มีนัยสำคัญของตำรับยาอายุวัฒนะ

ลำดับ	Pathway or Process	XD-score	q-value	Overlap/ Size
1	Linoleic acid metabolism	2.058	0.000	9/11
2	Steroid hormone biosynthesis	1.858	0.000	10/15
3	Arachidonic acid metabolism	1.828	0.000	17/26
4	Neuroactive ligand-receptor interaction	1.480	0.000	125/214
5	Renin-angiotensin system	1.385	0.000	10/16
6	Acute myeloid leukemia	1.319	0.000	28/52
7	Long-term potentiation	1.319	0.000	34/63
8	Non-small cell lung cancer	1.303	0.000	27/51
9	ErbB signaling pathway	1.256	0.000	39/84
10	Glioma	1.250	0.000	32/60
11	Adipocytokine signaling pathway	1.230	0.000	24/57
12	Bladder cancer	1.216	0.000	21/38
13	GnRH signaling pathway	1.211	0.000	42/83
14	Thyroid cancer	1.188	0.001	12/25
15	Pancreatic cancer	1.172	0.000	34/70
16	Type II diabetes mellitus	1.149	0.000	20/43
17	VEGF signaling pathway	1.141	0.000	32/62
18	Fc epsilon RI signaling pathway	1.126	0.000	34/65
19	Calcium signaling pathway	1.100	0.000	74/152
20	PPAR signaling pathway	1.098	0.001	16/39
21	Retinol metabolism	1.040	0.004	7/12
22	Prostate cancer	1.013	0.000	43/84
23	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	1.013	0.000	24/59

ลำดับ	Pathway or Process	XD-score	q-value	Overlap/ Size
24	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0.963	0.000	11/20
25	Long-term depression	0.911	0.000	23/57
26	Neurotrophin signaling pathway	0.871	0.000	52/121
27	Chronic myeloid leukemia	0.842	0.000	29/69
28	Insulin signaling pathway	0.838	0.000	50/123
29	Progesterone-mediated oocyte maturation	0.811	0.000	36/79
30	T cell receptor signaling pathway	0.786	0.000	41/102
31	Leishmaniasis	0.767	0.002	21/62
32	Shigellosis	0.759	0.008	18/56
33	Vascular smooth muscle contraction	0.758	0.000	39/89
34	Endometrial cancer	0.748	0.000	22/50
35	Aldosterone-regulated sodium reabsorption	0.747	0.002	15/38
36	Ether lipid metabolism	0.725	0.006	8/16
37	B cell receptor signaling pathway	0.708	0.000	25/69

วิถีที่มีนัยสำคัญ (significant pathways) ของสารประกอบตำรับยาอายุวัฒนะมีทั้งหมด 37 pathways สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม (รายละเอียดดังตารางที่ 13) ดังนี้

- 1) Environmental Information Processing จำนวน 4 pathways ประกอบด้วย Signal transduction 3 pathways และ Signaling molecules and interaction 1 pathway
- 2) Human Diseases จำนวน 13 pathways ประกอบด้วย Cancer, Infectious disease และ Endocrine and metabolic disease 9, 3, 1 pathways ตามลำดับ
- 3) Metabolism จำนวน 6 pathways ประกอบด้วย Lipid metabolism 4 pathways Metabolism of cofactors and vitamins และ Xenobiotics biodegradation and metabolism อย่างละ 1 pathway
- 4) Organismal Systems จำนวน 14 pathways ประกอบด้วย Endocrine system 6 pathways, Immune system และ Nervous system อย่างละ 3 pathways Circulatory system และ Excretory system อย่างละ 1 pathways

ตารางที่ 13 รายละเอียดการแบ่งกลุ่มของวิถีที่มีนัยสำคัญในตำรับยาอายุวัฒนะ

Environmental Information Processing:	
Signal transduction	ErbB signaling pathway
	VEGF signaling pathway
	Calcium signaling pathway
Signaling molecules and interaction	Neuroactive ligand-receptor interaction
Human Diseases:	
Cancer	Acute myeloid leukemia
	Non-small cell lung cancer
	Glioma
	Bladder cancer
	Thyroid cancer
	Pancreatic cancer
	Prostate cancer
	Chronic myeloid leukemia
Infectious disease (bacterial)	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection
	Shigellosis
Infectious disease (parasitic)	Leishmaniasis
Endocrine and metabolic disease	Type II diabetes mellitus
Metabolism:	
Lipid metabolism	Linoleic acid metabolism
	Steroid hormone biosynthesis
	Arachidonic acid metabolism
	Ether lipid metabolism
Metabolism of cofactors and vitamins	Retinol metabolism
Xenobiotics biodegradation and metabolism	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450
Organismal Systems:	

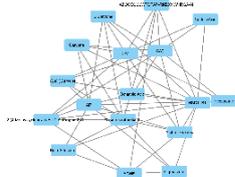
Circulatory system	Vascular smooth muscle contraction
Excretory system	Aldosterone-regulated sodium reabsorption
Endocrine system	Renin-angiotensin system
	Adipocytokine signaling pathway
	GnRH signaling pathway
	PPAR signaling pathway
	Insulin signaling pathway
	Progesterone-mediated oocyte maturation
Immune system	Fc epsilon RI signaling pathway
	T cell receptor signaling pathway
	B cell receptor signaling pathway
Nervous system	Long-term potentiation
	Long-term depression
	Neurotrophin signaling pathway

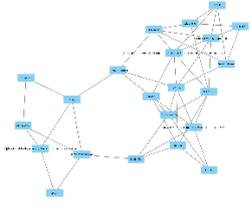
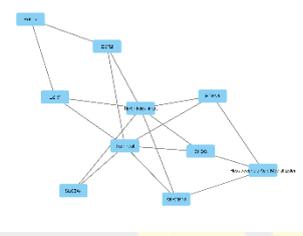
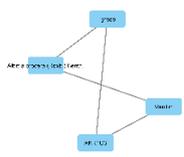
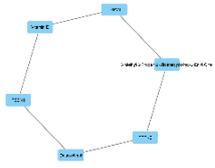
โมดูลที่สำคัญในเครือข่ายปฏิสัมพันธ์

ใช้ MCODE ซึ่งเป็นปลั๊กอินของโปรแกรม Cytoscape ในการวิเคราะห์โมดูลที่สำคัญ ผลพบว่า ได้โมดูล (Module) ทั้งหมด 9 โมดูล จากนั้นนำแต่ละโมดูลที่ได้มาทำการค้นหา gene ontology (GO) ด้วยโปรแกรม BinGO กำหนดค่า $p < 0.05$ โดยสามารถวิเคราะห์ gene ontology ได้ 5 โมดูล รวม pathways ทั้งหมดจำนวน 689 pathways มี pathways ที่ซ้ำกัน ทำให้เหลือ 632 pathways สรุปได้ดังตารางที่ 14

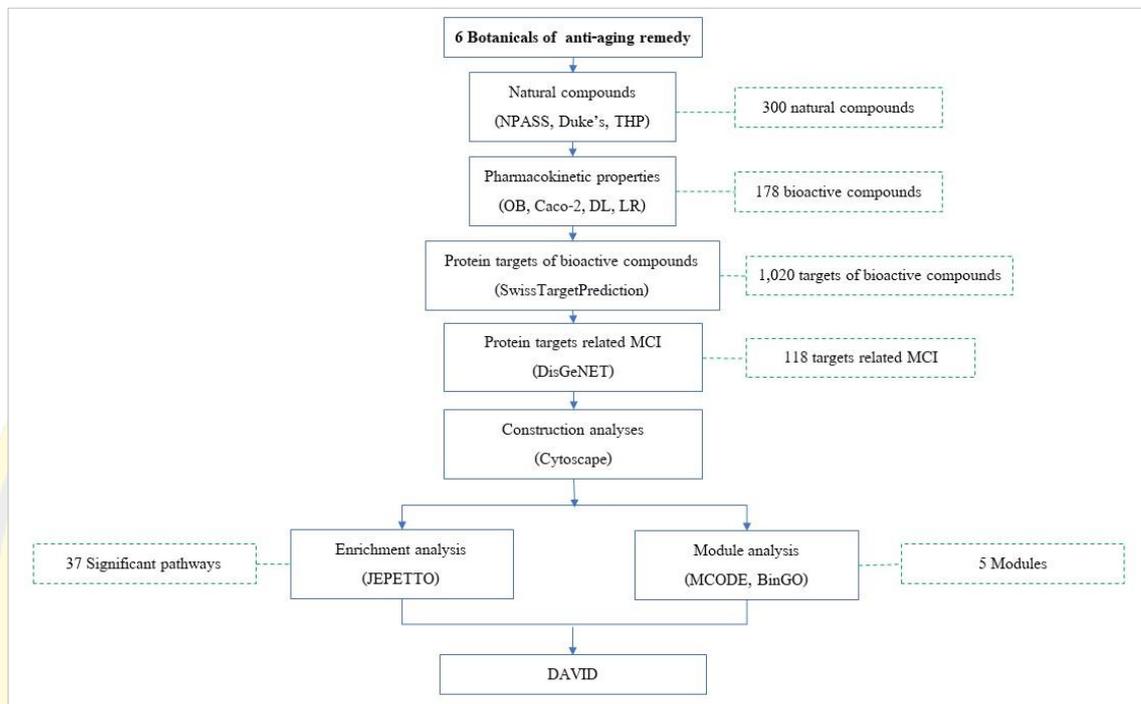
ตารางที่ 14 โมดูลที่สำคัญของตำรับยาอายุวัฒนะ

Module	MCODE scores	Nodes	Edges	Number of pathways	Genes
1	6.375	17	51	91	ACHE AR CA1 CA2 HSD11B1



	Module	MCODE scores	Nodes	Edges	Number of pathways	Genes
2		4.476	22	47	366	ADORA2A DRD2 SLC6A2 KDR NPC1L1 SIGMAR1 NR1H3 BCHE MAOB NR3C1 CHRM2
3		3.778	10	17	123	AKR1B10 SHBG ESR1 ESR2 SLC6A4 PTPN1
4		2.667	4	4	1	AKR1C3
5		2.4	6	6	108	PSEN1 PTPN2 TRPV1

ผลการศึกษาโครงข่ายทางเภสัชวิทยาของตำรับยาอายุวัฒนะ สามารถสรุปเป็นแผนภาพได้
ดังนี้



ภาพที่ 27 การศึกษาของ Network pharmacology ของตำรับยาอายุวัฒนะ

ระยะที่ 2 การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ และทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม

การทดลองที่ 2.1 การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

การเตรียมเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะ

การตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องยาทั้ง 6 ชนิด เทียบกับตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia; THP) ร่วมกับการตรวจสอบเครื่องยาจากผู้เชี่ยวชาญทางด้านพฤกษศาสตร์ ยื่นขอหมายเลขตัวอย่างอ้างอิงเครื่องยา (Voucher specimens) จากพิพิธภัณฑสถานสมุนไพร กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก พบว่าเครื่องยาที่นำมาใช้ในการศึกษาทุกตัวถูกต้องตรงตามชนิดตามการอ้างอิงทางพฤกษศาสตร์ แสดงผลดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการตรวจสอบลักษณะของเครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะ

ชื่อเครื่องยา	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	ลักษณะทางมหภาค (Macroscopical characteristics)	รหัสอ้างอิง (Voucher specimens)
ทิงถ่อน (Ting thon)	<i>Albizia procera</i> (Roxb.) Benth.	เปลือก		S. Obhasi 618101 (TTM-c No. 1000694)
ตะโกนา (Tako na)	<i>Diospyros rhodcalyx</i> Kurz	เปลือก		S. Obhasi 618102 (TTM-c No. 1000695)
บอระเพ็ด (Bora phet)	<i>Tinospora crispa</i> (L.)	เถา		S. Obhasi 618103 (TTM-c No. 1000696)
หญ้าแห้วหมู (Ya Haeo mu)	<i>Cyperus rotundus</i> L.	หัว เหง้า		S. Obhasi 618104 (TTM-c No. 1000697)
ข่อย (Khoi)	<i>Streblus asper</i> Lour.	เมล็ด		S. Obhasi 618105 (TTM-c No. 1000698)

ชื่อเครื่องยา	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	ลักษณะทางมหภาค (Macroscopical characteristics)	รหัสอ้างอิง (Voucher specimens)
พริกไทย (Phrik thai)	<i>Piper nigrum</i> L.	เมล็ด		S. Obhasi 618106 (TTM-c No. 1000699)

การตรวจสอบปริมาณสิ่งแปลกปลอม (foreign matters) โดยสุ่มตัวอย่างสมุนไพรแห้ง จำนวน 250-500 กรัม นำมาเกลี่ยในถาดอลูมิเนียม แล้วคัดแยกสิ่งแปลกปลอมด้วยตาเปล่าและแว่นขยายกำลังขยาย 10x ชั่งน้ำหนักสิ่งแปลกปลอมที่ได้ ผลการตรวจสอบแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการตรวจสอบปริมาณสิ่งแปลกปลอมในเครื่องยาดำรับยาอายุวัฒนะ

เครื่องยา	ชื่อวิทยาศาสตร์	สุ่มตัวอย่าง (กรัม)	น้ำหนักสิ่งแปลกปลอม (กรัม)	ค่าร้อยละ	ผลการตรวจสอบ
เปลือกทิงถ่อน	<i>Albizia procera (Roxb.) Benth.</i>	500	0.269	0.054	ผ่าน
เปลือกตะโกนา	<i>Diospyros rhodcalyx</i>	500	0.592	0.118	ผ่าน
เถาบอระเพ็ด	<i>Tinospora crispa L.</i>	500	0.934	0.187	ผ่าน
หัวหญ้าแห้วหมู	<i>Cyperus rotundus L.</i>	500	2.780	0.556	ผ่าน
เมล็ดข่อย	<i>Streblus asper Lour.</i>	250	1.188	0.475	ผ่าน
เมล็ดพริกไทยดำ	<i>Piper nigrum L.</i>	250	0.184	0.074	ผ่าน

จากตารางพบว่า เครื่องยาในตำรับยาอายุวัฒนะทุกตัวจากแหล่งในจังหวัดพิษณุโลก เป็นเครื่องยาที่ถูกต้องตรงตามตำรับ สิ่งแปลกปลอมส่วนใหญ่เป็นเศษหิน หรือส่วนของพืชที่ไม่ต้องการ โดยสิ่งแปลกปลอมมีในปริมาณไม่เกินมาตรฐานที่กำหนด

การตรวจสอบสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

1. คำนวณหาปริมาณของสารสกัด (extraction yield; EY)

ผงแห้งของตำรับยาอายุวัฒนะที่สกัดด้วย 95% Ethanol โดยการหมัก (maceration) นาน 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง เมื่อระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 วันจนน้ำหนักสารคงที่ สารสกัดที่ได้มีลักษณะเหนียวข้น สีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นฉุน (ดังภาพที่ 28) สามารถคำนวณร้อยละปริมาณสารสกัด (% yield) จากสูตร

$$\% \text{ yield (w/w)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดที่ได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักของผงยาที่ใช้ (กรัม)}} \times 100 = \frac{297.461 \text{ กรัม}}{1,200 \text{ กรัม}} \times 100 = 24.788 \text{ กรัม}$$

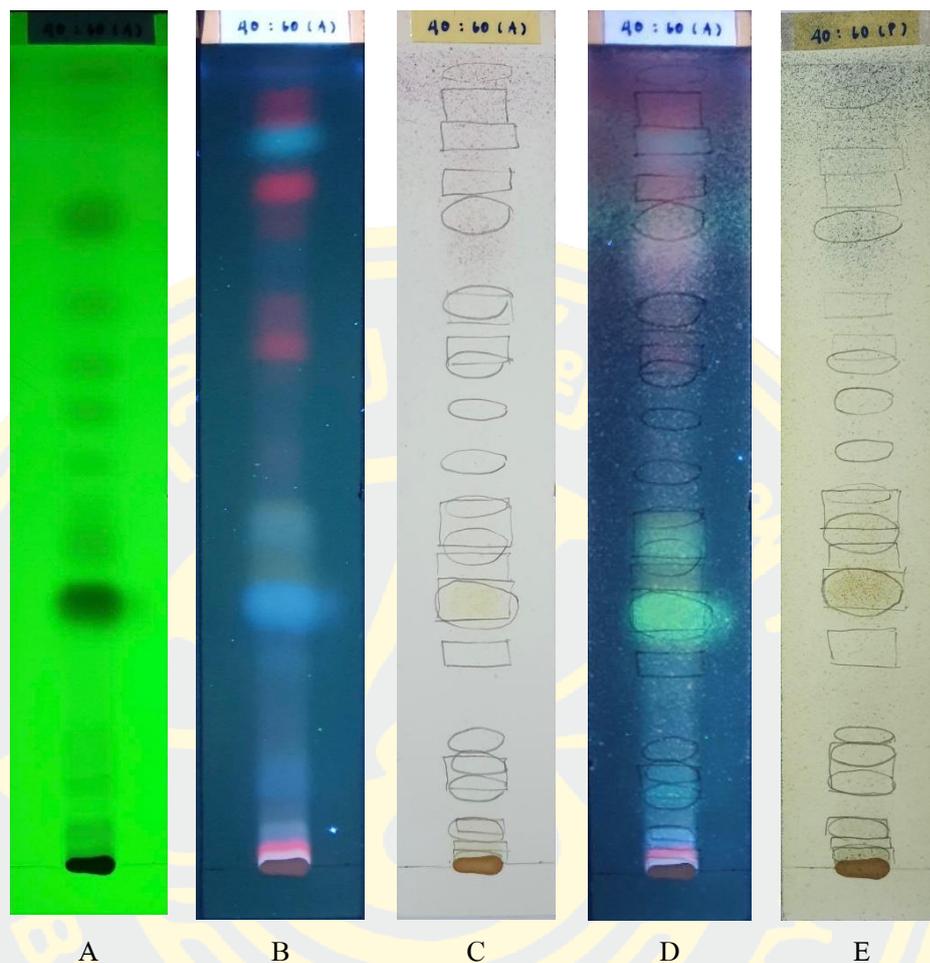
แสดงว่า ปริมาณผงยาดำรับยาอายุวัฒนะ 100 กรัม ได้สารสกัดจำนวน 24.79 กรัม คิดเป็นร้อยละ 24.79



ภาพที่ 28 สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

2. ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC)

ทดสอบที่วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) 3 ระบบ ได้แก่ Hexane: Dichloromethane, Ethyl acetate: Hexane, Dichloromethane: Methanol ในอัตราส่วน 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70 ตามลำดับ โดยวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) คือ Silica gel GF₂₅₄ ในระยะทางเคลื่อนที่ของสาร (Solvent front) 15 เซนติเมตร ตัวตรวจสอบคือ UV254, UV356, Anisaldehyde-sulfuric acid และ Phosphomolybdic acid จากการศึกษาพบว่าค่าของวัฏภาคเคลื่อนที่ในแต่ละระบบตามอัตราส่วนข้างต้นเป็นดังนี้ Hexane: Dichloromethane อยู่ระหว่าง 0.93–2.17 Ethyl acetate: Hexane อยู่ระหว่าง 1.32–3.08 Dichloromethane: Methanol อยู่ระหว่าง 3.7–4.5 สามารถจัดลำดับได้เป็น ขั้วต่ำ ขั้วกลาง และขั้วสูง ตามลำดับ โดยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่สามารถแยกสารได้อย่างเหมาะสมคือ Ethyl acetate: Hexane ในอัตราส่วน 40:60 รายละเอียดดังภาพที่ 29



ภาพที่ 29 ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วย TLC ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ
 วัฏภาคเคลื่อนที่ Ethyl acetate: Hexane อัตราส่วน 40:60

(A) ตรวจสอบภายใต้ UV254

(B) ตรวจสอบภายใต้ UV356

(C) ตรวจสอบด้วยสาร Anisaldehyde-sulfuric acid หลังนำไปอบ ภายใต้แสงธรรมชาติ (UV366)

(D) ตรวจสอบด้วยสาร Anisaldehyde-sulfuric acid หลังนำไปอบ ภายใต้ UV356

(E) ตรวจสอบด้วยสาร Phosphomolybdic acid หลังนำไปอบ ภายใต้แสงธรรมชาติ (UV366)

ตารางที่ 17 ค่า hR_f ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในวัฏภาคเคลื่อนที่ *Ethyl acetate: Hexane*
อัตราส่วน 40:60

แถบ	hR_f Value	ตัวตรวจสอบ				
		UV254	UV356	Anisaldehyde- sulfuric acid		Phosphomolybdi c acid
				UV366	UV356	UV366
1	0.67-1.33	++ quenching	++ สีขาว	-	++ สีขาว	++ สีเทาดำ
2	2.00-3.00	-	+++ สีแดง	-	+++ สีแดง	-
3	4.33-5.00	++ quenching	+ สีฟ้า	-	+ สีฟ้า	+ สีเทา
4	9.33-10.33	+ quenching	-	-	-	-
5	11.67-12.67	-	+ สีฟ้า	-	-	-
6	12.67-14.67	+ quenching	-	-	-	-
7	15.67-16.67	+ quenching	-	-	-	-
8	26.67-27.67	-	+ สีฟ้า	-	-	-
9	32.67-34.67	+++ quenching	+++ สีฟ้า	สีเหลือง	++ สีเขียว	สีน้ำตาล
10	37.33-38.67	+ quenching	++ สีเขียว	-	+ สีน้ำตาล	-
11	39.33-41.67	++ quenching	-	-	-	-
12	42.67-44.67	-	+ สีฟ้า	-	++ สีเขียว	-
13	46.67-52	+ quenching	-	-	+ สีน้ำตาล	-
14	50.33-52.33	+ quenching	-	-	-	-
15	56.67-58.67	++ quenching	-	-	-	-
16	62.67-63.33	+ quenching	-	-	-	-
17	64.67-65.33	-	++ สีแดง	-	+ สีแดง	-
18	69.33-70.67	-	+ สีแดง	-	-	-
19	70.67-80.33	+ quenching	-	-	+ สีแดง	-
20	76.33-76.67	-	-	-	+ สีขาว	++ สีเทาดำ
21	80.00-81.00	++ quenching	-	-	-	-
22	84.33-84.67	-	+++ สีแดง	-	++ สีแดง	-

แถบ	hR _f Value	ตัวตรวจสอบ				
		UV254	UV356	Anisaldehyde-sulfuric acid		Phosphomolybdi
				UV366	UV356	c acid
23	88.00-90.00	-	+++ สีฟ้า	-	+ สีเขียว	-
24	91.33-94.00	-	++ สีแดง	สีแดง	++ สีแดง	+ สีเทาดำ
25	96.33-98.33	+ quenching	+ สีฟ้า	สีแดง	++ สีขาว	+++ สีเทาดำ

+ quenching = การเรืองแสง

ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วย TLC ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ แสดงดังตารางที่ 17 ประกอบด้วย 25 แถบ เป็น quenching จำนวน 15 แถบ ภายใต้ UV254 สารที่เรืองแสงชัดที่สุดอยู่ที่ ค่า hR_f = 32.67-34.67 (แถบที่ 9) ภายใต้ UV365 พบแถบ fluorescent จำนวน 14 แถบ โดยมีจำนวน 9 แถบ ที่ไม่ตรงกับแถบที่ส่องภายใต้ UV254 แถบปรากฏสีขาว สีฟ้า สีแดง และสีเขียว

แผ่น TLC ที่พ่นด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid และส่องภายใต้แสงธรรมชาติ (UV366) พบสารจำนวน 4 แถบ เป็นแถบสีเหลืองและสีแดง และเมื่อส่องภายใต้ UV365 พบสารจำนวน 13 แถบ เป็นแถบ fluorescent สีขาว สีแดง สีฟ้า สีเขียว และสีน้ำตาล

แผ่น TLC ที่พ่นด้วย Phosphomolybdic acid ที่ส่องภายใต้แสงธรรมชาติ (UV366) พบสารจำนวน 6 แถบ เป็นแถบสีน้ำตาล สีเทาถึงเทาดำ

อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบสารด้วยวิธีการสเปกซ์ Anisaldehyde-sulfuric acid และ Phosphomolybdic acid พบสารปรากฏขึ้นมาเพิ่ม 1 แถบ คือแถบที่ 20 มีค่า hR_f = 76.33-76.67 โดยปรากฏเป็นแถบสีขาว เมื่อส่องภายใต้ UV365 ของการสเปกซ์ Anisaldehyde-sulfuric acid และปรากฏสารสีเทาดำ เมื่อส่องภายใต้แสงธรรมชาติของการสเปกซ์ Phosphomolybdic acid

การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

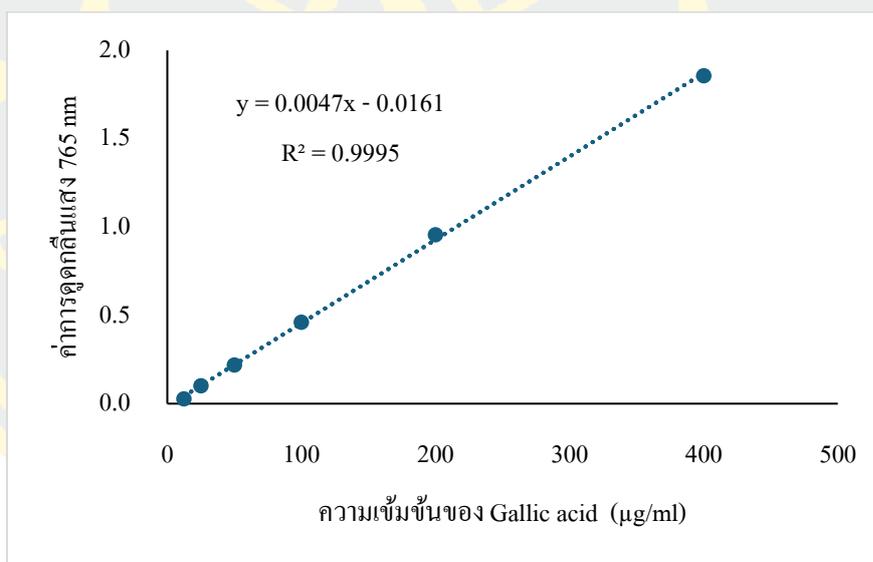
การวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content; TPC)

คำนวณปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมเทียบกับกราฟมาตรฐาน สารละลาย Gallic acid ที่ระดับความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100, 200, และ 400 µg/ml ใน Absolute ethanol สารมาตรฐาน Gallic acid มีค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงกับความเข้มข้น (ตั้ง

ตารางที่ 18) เป็นกราฟเส้นตรง มีสมการ $y = 0.0047x - 0.0161$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9995 ดังภาพที่ 30

ตารางที่ 18 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี TPC

ความเข้มข้นของ Gallic acid ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง 765 nm (Mean \pm SD)
12.5	0.026 \pm 0.014
25	0.101 \pm 0.015
50	0.219 \pm 0.029
100	0.461 \pm 0.023
200	0.955 \pm 0.035
400	1.857 \pm 0.047



ภาพที่ 30 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ด้วยวิธี TPC

ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่ความเข้มข้น 2 mg/ml เทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic acid หาปริมาณฟีนอลิกรวมจากค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ โดยการแทนค่าลงในสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 164.029 ± 5.086 mg of GAE equivalent/ g of extract แสดงให้เห็นว่าสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ 1 g มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมเทียบเท่ากับสารละลายกรดแกลลิก 164.029 ± 5.086 mg

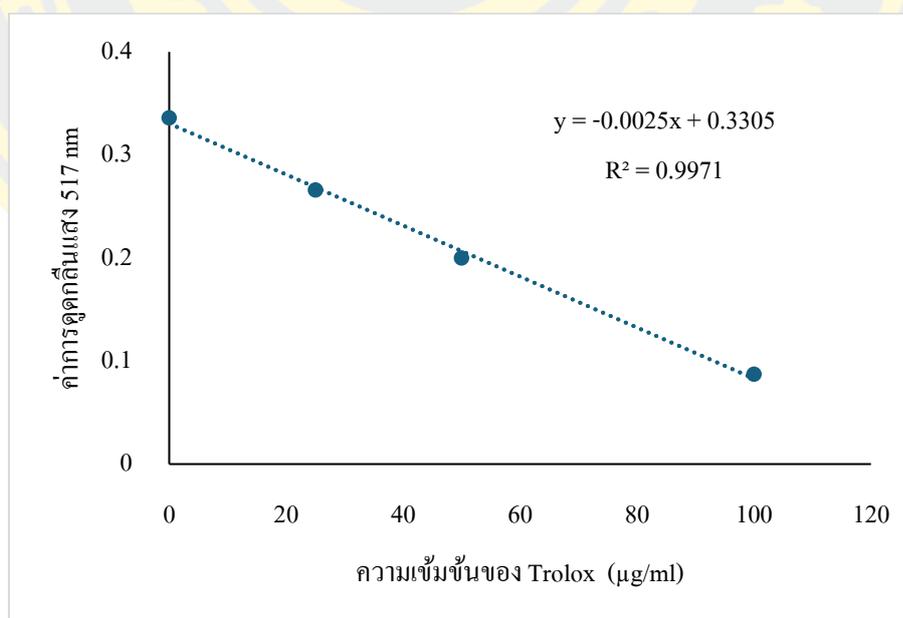
วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (scavenging activity)

- DPPH radical scavenging assay

คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ใน DI water สารมาตรฐาน Trolox มีค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงกับความเข้มข้น (ดังตารางที่ 19) เป็นกราฟเส้นตรง มีสมการ $y = -0.0025x + 0.3305$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9971 ดังภาพที่ 31

ตารางที่ 19 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี DPPH assay

ความเข้มข้นของ Trolox ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง 517 nm (Mean \pm SD)
0	0.000 \pm 0.023
25	0.266 \pm 0.134
50	0.200 \pm 0.116
100	0.087 \pm 0.050



ภาพที่ 31 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ด้วยวิธี DPPH assay

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่ความเข้มข้น 10 mg/ml เทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox หา

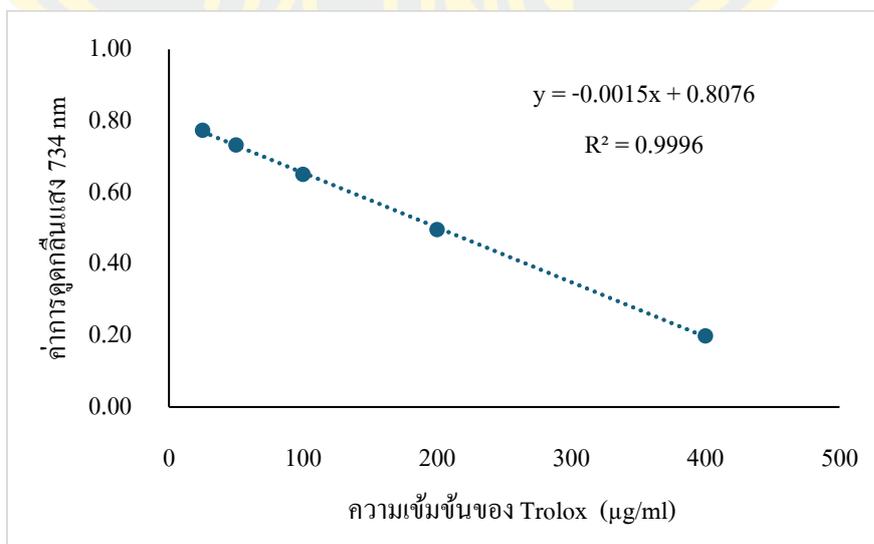
ปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ โดยการแทนค่าลงในสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) มีปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 9.470 ± 0.846 mg of Trolox equivalent/ g of extract แสดงให้เห็นว่าสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ 1 g มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารละลาย Trolox 9.470 ± 0.846 mg

- ABTS radical cation decolorization assay

คำนวณปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS เทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, และ 400 $\mu\text{g/ml}$ ใน Absolute ethanol สารมาตรฐาน Trolox มีค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงกับค่าความเข้มข้น (ดังตารางที่ 20) เป็นกราฟเส้นตรง มีสมการ $y = -0.0015x + 0.8076$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9996 ดังภาพที่ 32

ตารางที่ 20 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี ABTS assay

ความเข้มข้นของ Trolox ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง 734 nm (Mean \pm SD)
25	0.774 ± 0.387
50	0.733 ± 0.367
100	0.651 ± 0.326
200	0.497 ± 0.249
400	0.199 ± 0.049



ภาพที่ 32 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ด้วยวิธี ABTS assay

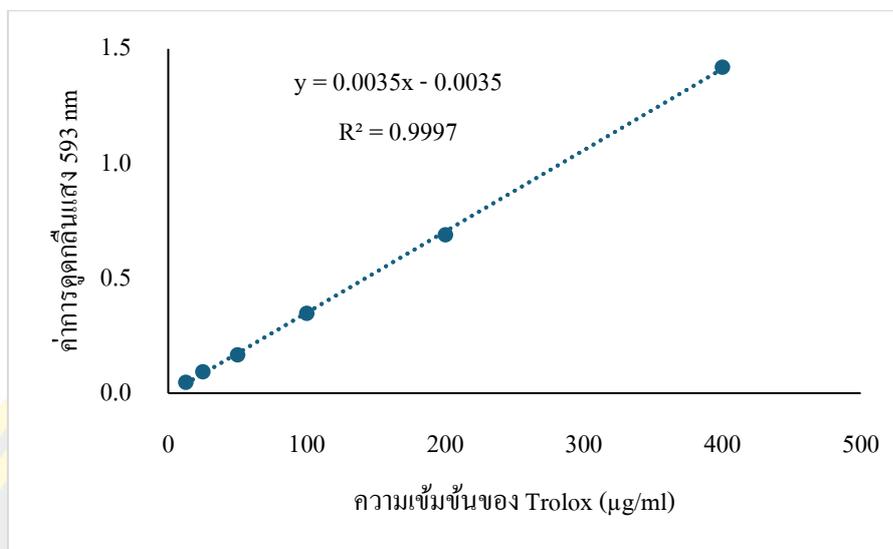
ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่ความเข้มข้น 10 mg/ml เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox หาปริมาณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ โดยการแทนค่าลงในสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) มีความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเท่ากับ 20.757 ± 1.306 mg of Trolox equivalent/ g of extract แสดงให้เห็นว่าสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ 1 g มีความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารละลาย Trolox 20.757 ± 1.306 mg

- Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

คำนวณปริมาณความสามารถในการลดอนุมูลอิสระเทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox ที่ระดับความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100, 200, และ 400 $\mu\text{g/ml}$ ใน Absolute ethanol รายงานผลเป็นค่า FRAP value คือ มิลลิกรัมสมมูลของ Trolox ต่อกรัมของสารสกัด (mg of Trolox equivalent/ g of extract) สารมาตรฐาน Trolox มีค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงกับค่าความเข้มข้น (ดังตารางที่ 21) เป็นกราฟเส้นตรง มีสมการ $y = 0.0035x - 0.0035$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9997 ดังภาพที่ 33

ตารางที่ 21 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี FRAP assay

ความเข้มข้นของ Trolox ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง 593 nm (Mean \pm SD)
12.5	0.047 ± 0.011
25	0.094 ± 0.009
50	0.168 ± 0.010
100	0.348 ± 0.020
200	0.690 ± 0.028
400	1.420 ± 0.053



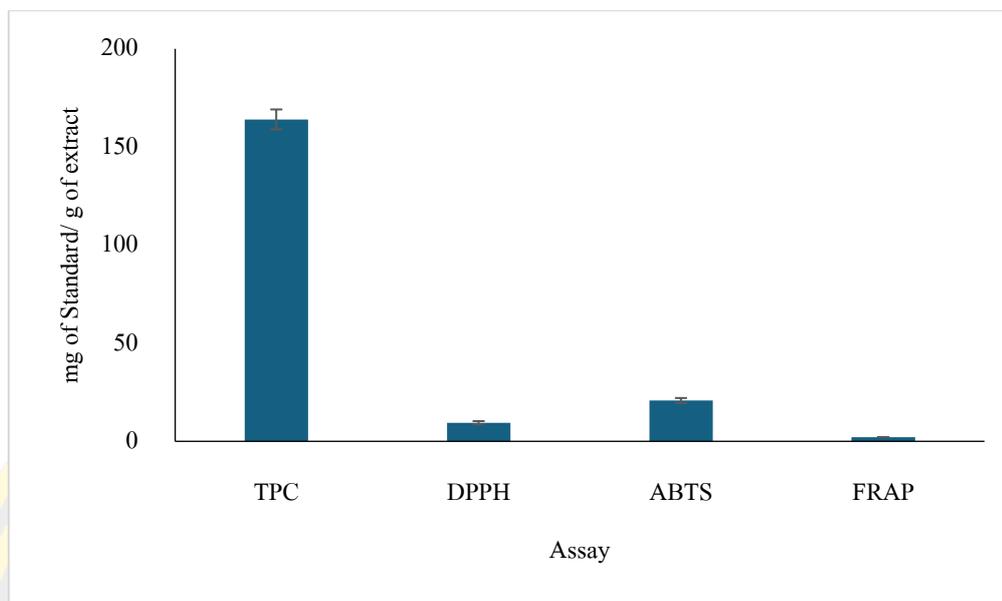
ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ด้วยวิธี FRAP assay

ความสามารถในการลดอนุมูลอิสระของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่ความเข้มข้น 2 mg/ml เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox หาความสามารถในการลดอนุมูลอิสระจากค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ โดยการแทนค่าลงในสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) มีความสามารถในการลดอนุมูลอิสระเท่ากับ 2.106 ± 0.019 mg of Trolox equivalent/ g of extract แสดงให้เห็นว่าสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ 1 g มีความสามารถในการลดอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารละลาย Trolox 2.106 ± 0.019 mg

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ผ่านคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยแสดงให้เห็นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระผ่านการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP รายละเอียดดังตารางที่ 22 และภาพที่ 34

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะด้วยวิธีต่างๆ เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

สาร	TPC mg of GAE/ g extract	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (mg Trolox/ g extract)		
		DPPH	ABTS	FRAP
AAR	164.029 ± 5.086	9.470 ± 0.846	20.757 ± 1.306	2.106 ± 0.019



ภาพที่ 34 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะด้วยวิธีต่างๆ เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

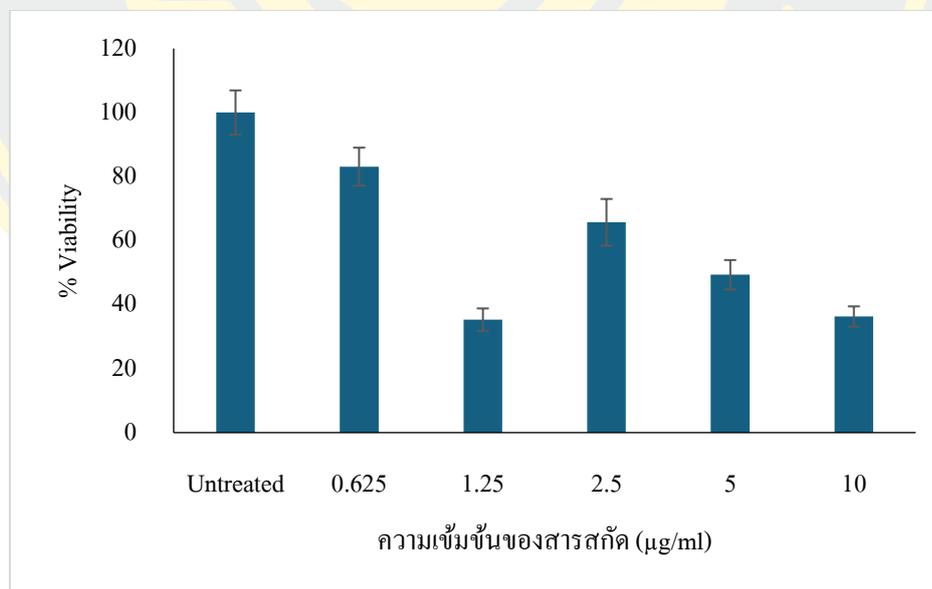
การทดลองที่ 2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม

ทดสอบความเข้มข้นของ AAR ที่เป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity) ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะต่อเซลล์ SH-SY5Y ความเข้มข้น 2×10^4 cells/well ที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ พบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ดังตารางที่ 23 และภาพที่ 35

ตารางที่ 23 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นสารสกัด ($\mu\text{g/ml}$)	ร้อยละการรอดชีวิต
0.625	83.072 \pm 5.939
1.25	35.267 \pm 3.527
2.5	65.704 \pm 7.282
5	49.321 \pm 4.581
10	36.254 \pm 3.180



ภาพที่ 35 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม

วิเคราะห์เปรียบเทียบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม (untreated) ด้วยสถิติ One-way ANOVA ผลพบว่า ค่าสถิติทดสอบ $F = 86.206$, $p\text{-value} = .000$ แสดงว่ามีร้อยละการรอดชีวิตอย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ .05 ดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสาร AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12584.904	5	2516.981	86.206 ^{***}	.000
Within Groups	437.959	15	29.197		
Total	13022.863	20			

** ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ < .05

เมื่อทดสอบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม เป็นรายคู่ด้วยการเปรียบเทียบแบบพหุคูณ โดยสถิติ LSD แสดงผลดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของร้อยละการรอดชีวิตของกลุ่มที่ได้รับสาร AAR ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม

	ความเข้มข้นของสารสกัด AAR ($\mu\text{g/ml}$)				
	0.625	1.25	2.5	5	10
Mean Difference	16.928 ^{**}	64.733 ^{***}	34.296 ^{***}	50.679 ^{***}	63.746 ^{***}
Sig.	.001	.000	.000	.000	.000

** ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ < .01

*** ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ < .001

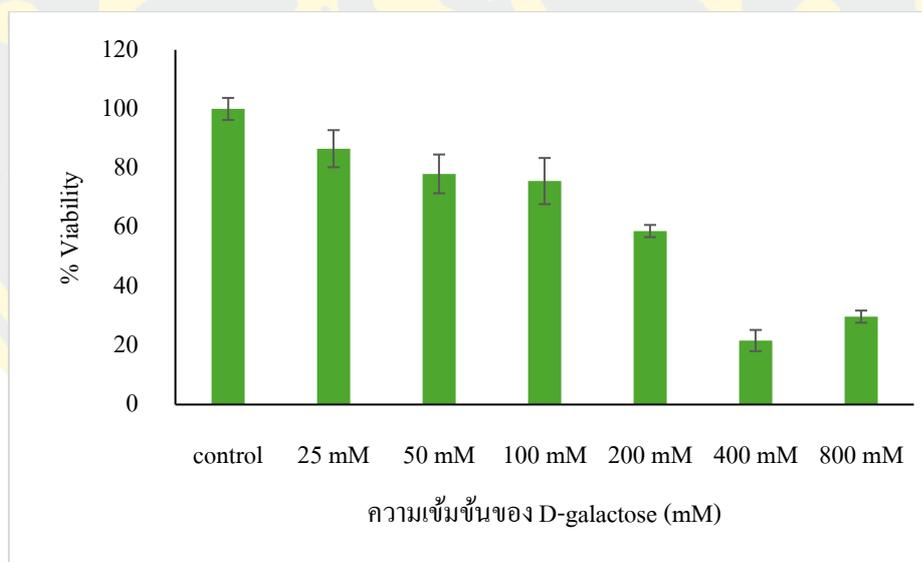
สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.625-10 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้น โดยผลต่างของความถี่ของ AAR ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ อยู่ที่ 63.746 และ AAR ที่ความเข้มข้น 0.625 $\mu\text{g/ml}$ อยู่ที่ 16.928 แสดงให้เห็นว่า สาร AAR ที่ความเข้มข้นสูงมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ลดลง

ทดสอบความเข้มข้นของ D-galactose ที่เป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity) ของสาร D-galactose ต่อเซลล์ SH-SY5Y ความเข้มข้น 2×10^4 cells/well ที่ได้รับสาร D-galactose ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 400, 800 mM พบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ดังตารางที่ 26

ตารางที่ 26 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร D-galactose ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น D-galactose (mM)	ร้อยละการรอดชีวิต
25	86.552 ± 6.272
50	78.032 ± 6.559
100	75.592 ± 7.817
200	58.687 ± 2.069
400	21.642 ± 3.588
800	29.736 ± 2.055



ภาพที่ 36 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร D-galactose ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม

วิเคราะห์เปรียบเทียบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสาร D-galactose ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม (Control) ด้วยสถิติ One-way ANOVA ผลพบว่า ค่าสถิติทดสอบ $F = 129.980$, $p\text{-value} = .000$ แสดงว่ามีร้อยละการรอดชีวิตอย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ .05 ดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับ D-galactose ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20266.392	6	3377.732	129.980 ^{***}	.000
Within Groups	545.719	21	25.987		
Total	20812.111	27			

** ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ < .001

เมื่อทดสอบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสาร D-galactose ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม เป็นรายคู่ด้วยการเปรียบเทียบแบบพหุคูณ โดยสถิติ LSD ดังตารางที่ 28 ตารางที่ 28 การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของร้อยละการรอดชีวิตของกลุ่มที่ได้รับ AAR ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม

	ความเข้มข้นของ D-galactose (mM)					
	25	50	100	200	400	800
Mean Difference	12.962 ^{**}	21.481 ^{***}	23.922 ^{***}	40.826 ^{***}	77.871 ^{***}	69.334 ^{***}
Sig.	.002	.000	.000	.000	.000	.000

** ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ < .01

*** ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ < .001

สาร D-galactose ที่ความเข้มข้นระหว่าง 25-800 mM มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้น โดยผลต่างของความถี่สูงสุดอยู่ที่ความเข้มข้น 800 mM มีค่า 69.334 และความเข้มข้นต่ำสุดที่ 25 mM มีค่า 12.962 แสดงให้เห็นว่า สาร D-galactose ที่ความเข้มข้นต่ำมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่สูง

โดยความเข้มข้นของ D-galactose ที่ถูกพิจารณาไปใช้ในการปกป้องเซลล์ประสาทคือความเข้มข้นที่ 50 และ 100 mM เนื่องจากทำให้การรอดชีวิตของเซลล์แตกต่างจากกลุ่มควบคุมน้อยกว่า 50

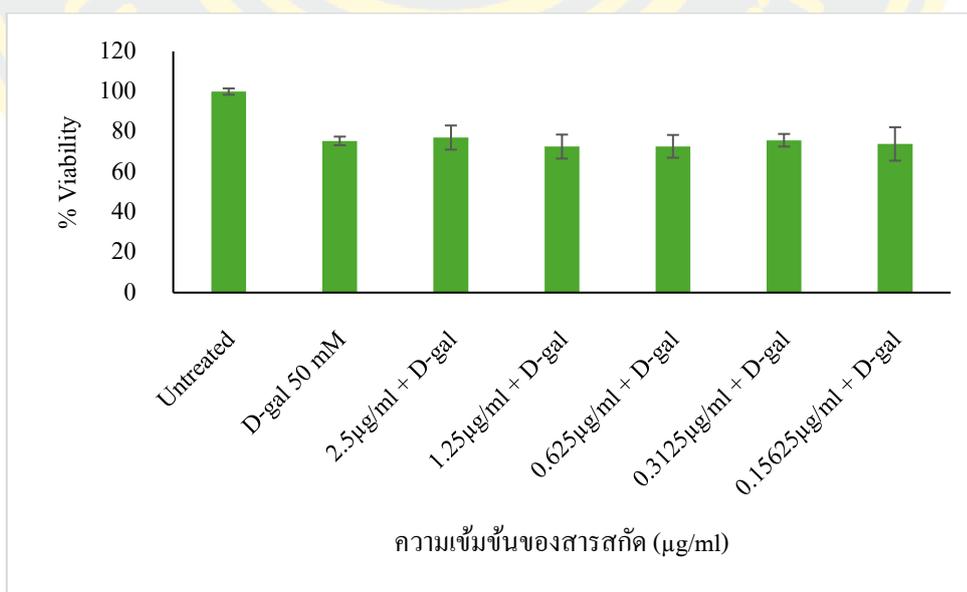
ผลของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะต่อการปกป้องเซลล์ประสาท

- D-galactose ความเข้มข้น 50 mM

เซลล์ SH-SY5Y ที่ความเข้มข้น 2×10^4 cells/well ที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ความเข้มข้น 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ทำการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมด้วย D-galactose ความเข้มข้น 50 mM เพาะเลี้ยงต่อ 24 ชั่วโมง โดยร้อยละการรอดชีวิต (% Cell viability) ของกลุ่มที่ได้รับ D-galactose ความเข้มข้น 50 mM เท่ากับ 75.458 ± 2.141 และร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับสารสกัด AAR ดังตารางที่ 29 และภาพที่ 37

ตารางที่ 29 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร AAR ความเข้มข้นต่างๆ และสาร D-galactose ความเข้มข้น 50 mM

ความเข้มข้นสารสกัด ($\mu\text{g/ml}$)	ร้อยละการรอดชีวิต
0.15625	73.946 ± 8.328
0.3125	75.781 ± 3.153
0.625	72.767 ± 5.660
1.25	72.636 ± 5.975
2.5	77.135 ± 5.995



ภาพที่ 37 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสาร D-galactose ความเข้มข้น 50 mM เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม

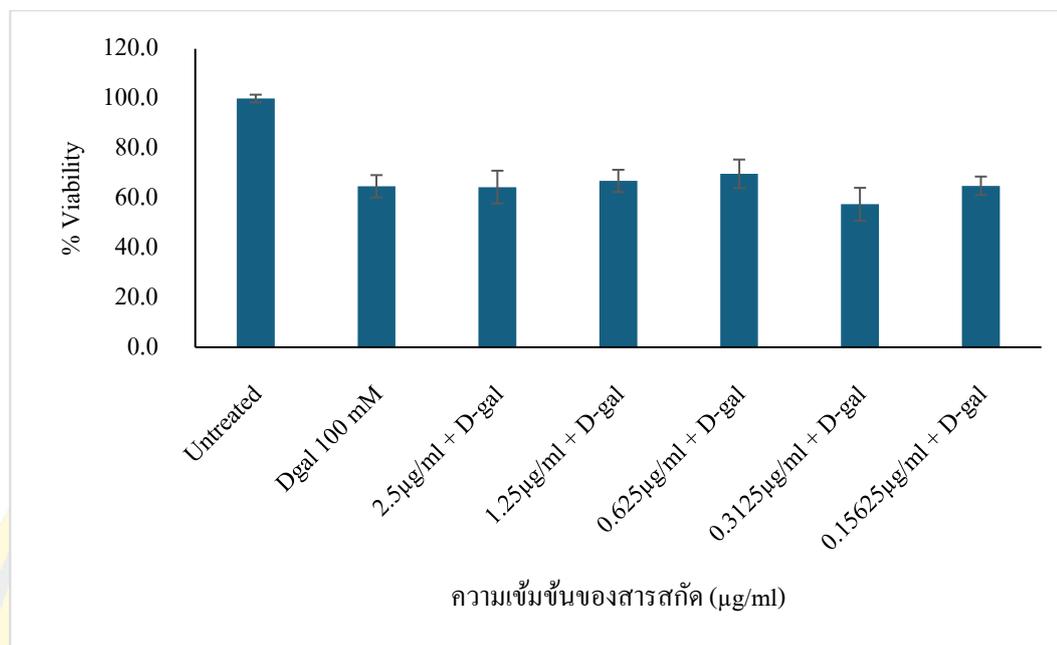
วิเคราะห์เปรียบเทียบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม (untreated) ด้วยสถิติ Kruskal-Wallis Test ผลพบว่า ไม่พบความแตกต่างของร้อยละการรอดชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่าสถิติทดสอบ Chi-Square = 12.383, p -value = .054

- D-galactose ความเข้มข้น 100 mM

เซลล์ SH-SY5Y ที่ความเข้มข้น 2×10^4 cells/well ที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ความเข้มข้น 0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ทำการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมด้วย D-galactose ความเข้มข้น 100 mM เพาะเลี้ยงต่อ 24 ชั่วโมง โดยร้อยละการรอดชีวิต (% cell viability) ของกลุ่มที่ได้รับ D-galactose ความเข้มข้น 100 mM เท่ากับ 64.713 ± 4.494 และร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับสารสกัด AAR เป็นดังตารางที่ 30 และภาพที่ 38

ตารางที่ 30 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร AAR ความเข้มข้นต่างๆ และสาร D-galactose ความเข้มข้น 100 mM

ความเข้มข้นสารสกัด ($\mu\text{g/ml}$)	ร้อยละการรอดชีวิต
0.15625	64.905 ± 3.725
0.3125	57.509 ± 6.590
0.625	69.731 ± 5.737
1.25	66.892 ± 4.463
2.5	64.410 ± 6.566



ภาพที่ 38 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสาร D-galactose ความเข้มข้น 100 mM เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม

วิเคราะห์เปรียบเทียบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสาร AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม (Control) ด้วยสถิติ Kruskal-Wallis Test ผลพบว่า ค่าสถิติทดสอบ Chi-Square = 14.208, p -value = .027 แสดงว่ามีร้อยละการรอดชีวิตอย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

เมื่อทดสอบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสาร AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated) เป็นรายคู่ด้วยการเปรียบเทียบระหว่างคู่ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test ได้ผลดังตารางที่ 31

ตารางที่ 31 การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของร้อยละการรอดชีวิตของกลุ่มที่ได้รับ AAR ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม

	D-gal	ความเข้มข้นของสารสกัด AAR ($\mu\text{g/ml}$)				
	100 mM	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625
Mann-Whitney U	0.000*	0.000	0.000*	0.000*	0.000	0.000*
Exact Sig.	.016	.057	.029	.029	.057	.029

* ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ < .05

เมื่อทดสอบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสาร AAR ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร D-galactose ความเข้มข้น 100 mM เป็นรายคู่ด้วยการเปรียบเทียบระหว่างคู่ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test ดังตารางที่ 32

ตารางที่ 32 การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของร้อยละการรอดชีวิตของกลุ่มที่ได้รับ AAR ความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มที่ได้รับสาร D-galactose ความเข้มข้น 100 mM

	Untreated	ความเข้มข้นของสารสกัด AAR ($\mu\text{g/ml}$)				
		2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625
Mann-Whitney U	0.000*	7.000	7.000	7.000	2.000	8.500
Exact Sig.	.016	1.000	.556	.556	.143	.730

* ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $< .05$

ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร D-galactose ความเข้มข้น 100 mM พบว่า ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม แสดงให้เห็นว่า สารทดสอบไม่มีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วย D-galactose ความเข้มข้น 100 mM

ระยะที่ 3 การศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลอง

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ขนาดของกลุ่มตัวอย่างคงเหลือที่ 29 ตัว เนื่องจากระหว่างการทดลองมีการสูญเสียหนูทดลอง คิดเป็นร้อยละการคงอยู่เท่ากับ 90.625 ผู้วิจัยจึงนำข้อมูลของหนูที่คงเหลือมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการฝึกหนูทดลอง

การฝึกหนูทดลอง ในวันที่ 1 เป็นการปล่อยหนูให้ขึ้นบนแท่นที่โผล่เหนือน้ำ เป็นระยะเวลา 15 วินาที ผลพบว่า หนูทดลองทุกตัวสามารถขึ้นบนแท่นเหนือน้ำได้อย่างน้อย 15 วินาที ทั้ง 2 ครั้ง

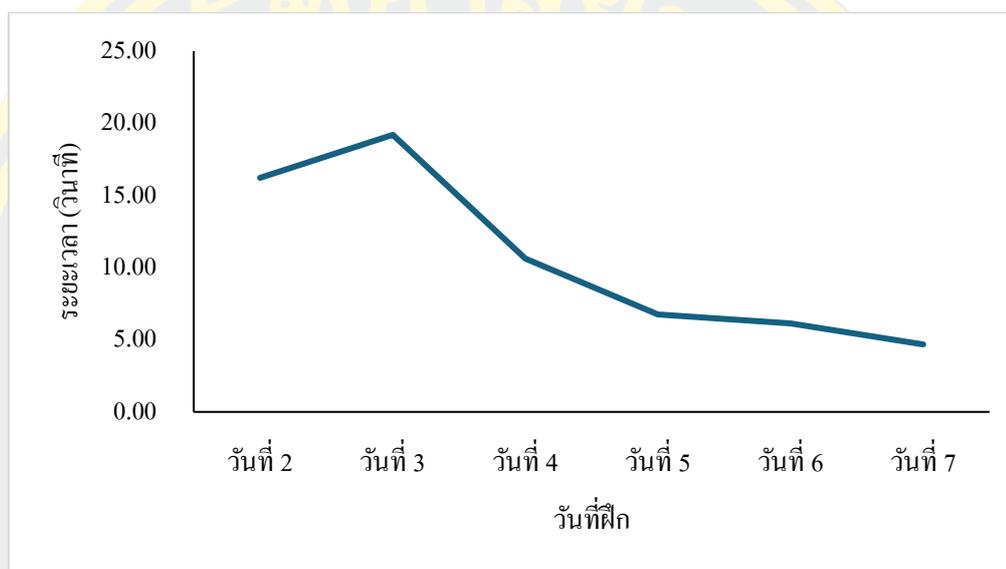
การฝึกหนูทดลอง ในวันที่ 2 เป็นการปล่อยหนูลงในอ่างทรงกลมบริเวณจุดที่มีสัญลักษณ์ต่างๆ โดยให้หนูว่ายน้ำหาแท่นที่โผล่เหนือน้ำ ซึ่งอยู่กึ่งกลางอ่าง ระยะเวลาเฉลี่ยตั้งแต่ปล่อยหนูลงน้ำจนหนูหาแท่นเจอ (Escape latency: EL) เท่ากับ 16.217 ± 9.485 วินาที ใช้ระยะเวลาสูงสุดที่ 48 วินาที และใช้ระยะเวลาต่ำสุดที่ 5 วินาที

การฝึกหนูทดลอง ในวันที่ 3-7 เป็นการปล่อยหนูลงในอ่างทรงกลมบริเวณจุดที่มีสัญลักษณ์ต่างๆ โดยให้หนูว่ายน้ำหาแท่นที่อยู่ใต้น้ำ บริเวณใดบริเวณหนึ่ง เป็นเวลา 60 วินาที ระยะเวลาเฉลี่ยตั้งแต่ปล่อยหนูลงน้ำจนหนูหาแท่นเจอ (EL) ในวันที่ 3 มีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น เท่ากับ 19.196 ± 9.954 วินาที ใช้ระยะเวลาสูงสุดที่ 40 วินาที และใช้ระยะเวลาต่ำสุดที่ 4 วินาที และในวันที่ 4-7 มีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาที่ลดลงตามลำดับ จนถึงวันที่ 7 มีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาการฝึกเท่ากับ 4.674 ± 2.700 วินาที ใช้ระยะเวลาสูงสุดที่ 14 วินาที และใช้ระยะเวลาต่ำสุดที่ 2 วินาที ระยะเวลาตั้งแต่ปล่อยหนูลงน้ำจนหนูหาแท่นใต้น้ำเจอ (EL) ในการฝึกแต่ละวัน แสดงผลดังตารางที่ 33 และภาพที่ 39

ตารางที่ 33 ระยะเวลาเฉลี่ยที่หนูทดลองหาแท่นใต้น้ำเจอ (EL) ในวันที่ทำการฝึก

วันที่ฝึก	ระยะเวลา Escape latency (วินาที)		
	ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าเฉลี่ย
วันที่ 2	48	5	16.217 ± 9.485
วันที่ 3	40	4	19.196 ± 9.954
วันที่ 4	38	3	10.620 ± 7.840

วันที่ฝึก	ระยะเวลา Escape latency (วินาที)		
	ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าเฉลี่ย
วันที่ 5	16	2	6.761 ± 3.331
วันที่ 6	16	2	6.130 ± 3.860
วันที่ 7	14	2	4.674 ± 2.700



ภาพที่ 39 ระยะเวลาเฉลี่ยที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจือ (EL) ในช่วงการฝึก

จากนั้นนำค่าเฉลี่ยของระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจือ (EL) ในช่วงการฝึก มาทำการแบ่งกลุ่มทดลอง โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว กำหนดให้แต่ละกลุ่มมีค่า EL ที่ใกล้เคียงกัน รายละเอียดการแบ่งกลุ่มดังตารางที่ 34

ตารางที่ 34 ระยะเวลาเฉลี่ยที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจือ (EL) ในแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	จำนวน	ระยะเวลา Escape latency (วินาที)		
		ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด	ค่าเฉลี่ย
กลุ่มที่ 1 Naïve control (None)	7	17.65	5.2	9.408 ± 4.357
กลุ่มที่ 2 Control (Water)	8	12.05	6.6	9.683 ± 2.254
กลุ่มที่ 3 Treatment (AAR)	7	11.9	5.85	9.217 ± 2.221
กลุ่มที่ 4 Positive control (Donepezil)	7	13.6	5.9	9.458 ± 2.616

ผลการวิเคราะห์ระยะเวลาเฉลี่ยที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจือ (EL) ในช่วงฝึกของหนูทดลองแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ One-way ANOVA พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$, Sig. = .995) แสดงว่าหนูทุกกลุ่มมีความสามารถในการเรียนรู้และจดจำไม่ต่างกัน

ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วย MWM ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

ทดสอบการเรียนรู้และความจำ (Escape latency) ด้วยการทดสอบระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจือ (Escape latency: EL) ในวันที่ 1, วันที่ 14, วันที่ 28 และวันที่ 42 หลังจากป้อนสารทดสอบ (Water, AAR, Donepezil) พิภเป็นระยะเวลา 40 นาที และฉีดด้วยสารเหนียวน้ำ (D-galactose)

ทดสอบความจำกลับคืน (Retention time) ด้วยการนำแท่นได้น้ำออก บันทึกเวลารวมที่หนูว่ายวนในโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำอยู่ (Total time spent in platform: TTSP) ทำการทดสอบในวันรุ่งขึ้นก่อนทำการป้อนสารทดสอบและฉีดสารเหนียวน้ำ รายละเอียดดังตารางที่ 35 ตารางที่ 35 ระยะเวลาเฉลี่ยของหนูทดลองแต่ละกลุ่มในการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วย MWM

	ระยะเวลาเฉลี่ย (วินาที)							
	Escape latency: EL				Total time spent in platform: TTSP			
	EL1	EL2	EL3	EL4	TTSP1	TTSP2	TTSP3	TTSP4
กลุ่มที่ 1	9.408 ±	3.500 ±	10.333	12.500	23.667	23.667	27.667	17.500
(None)	4.357	2.110	± 2.246	± 2.202	± 4.477	± 2.894	± 2.028	± 1.803
กลุ่มที่ 2	9.683 ±	8.857 ±	8.429 ±	9.714 ±	21.714	25.143	23.857	22.143
(Water)	2.254	3.979	1.412	3.013	± 3.393	± 2.730	± 1.519	± 1.487
กลุ่มที่ 3	9.217 ±	5.857 ±	5.429 ±	4.286 ±	22.286	21.000	25.142	22.857
(AAR)	2.221	1.818	0.869	0.644	± 2.317	± 1.864	± 1.299	± 1.242
กลุ่มที่ 4	9.458 ±	7.167 ±	8.333 ±	7.667 ±	19.833	21.167	20.000	23.833
(Donepezil)	2.616	2.688	2.616	2.260	± 3.060	± 2.833	± 1.571	± 1.078

EL1-4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจือในวันที่ 1, 14, 28, 42 ตามลำดับ

TTSP1-4 = เวลารวมที่หนูทดลองว่ายวนในโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำ ในวันที่ 2, 15, 29, 43 ตามลำดับ

ผลของระยะเวลาในการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองแต่ละกลุ่มที่ได้รับสารแตกต่างกัน ด้วยสถิติ Kruskal Wallis Test กำหนดสมมติฐานทางสถิติ ดังนี้

H_0 : ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการทดสอบระหว่างกลุ่มไม่แตกต่างกัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการทดสอบระหว่างกลุ่มแตกต่างกันอย่างน้อย 1 กลุ่ม

ตารางที่ 36 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการทดสอบระหว่างกลุ่ม

	ระยะเวลาเฉลี่ย (วินาที)							
	Escape latency: EL				Total time spent in platform: TTSP			
	EL1	EL2	EL3	EL4	TTSP1	TTSP2	TTSP3	TTSP4
Chi-square	.676	4.067	3.140	9.755*	1.631	1.613	8.092*	7.837*
p-value	.879	.254	.371	.021	.652	.657	.044	.050

* นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

EL1-4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอยู่ในวันที่ 1, 14, 28, 42 ตามลำดับ

TTSP1-4 = ระยะเวลารวมทั้งหนูทดลองว่ายวนในโซนที่เคยมึแท่นได้น้ำ ในวันที่ 2, 15, 29, 43 ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองแต่ละกลุ่ม ดังตารางที่ 36 พบว่า มีช่วงระยะเวลา 3 ช่วง ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 ได้แก่ ช่วงระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอยู่ในวันที่ 4 (EL4) ค่าสถิติทดสอบ Chi-square = 9.755, p -value = .021 ระยะเวลารวมทั้งหนูทดลองว่ายวนในโซนที่เคยมึแท่นได้น้ำในวันที่ 29 (TTSP3) และในวันที่ 43 (TTSP4) ค่าสถิติทดสอบ Chi-square = 8.092, p -value = .044 และ Chi-square = 7.837, p -value = .050 ตามลำดับ

เมื่อทดสอบเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองในแต่ละกลุ่มเป็นรายคู่ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test โดยกำหนดสมมติฐานทางสถิติ ดังนี้

H_0 : ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการทดสอบ ทั้ง 2 กลุ่ม ไม่แตกต่างกัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการทดสอบทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างกัน

1) กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None) กับ กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม (Water)

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None) กับ กลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม (Water) ได้ผลดังตารางที่ 37

ตารางที่ 37 การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม None กับ Water

		EL4	TTSP3	TTSP4
Mean Rank	None	8.83	8.33	4.83
	Water	4.17	4.67	8.17
Mann-Whitney U		4.00*	7.00	8.00
Exact Sig. (2-tailed)		.026	.093	.132

* นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

EL4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอในวันที่ 42

TTSP3-4 = ระยะเวลารวมทั้งหนูทดลองว่ายวนในโซนที่เคมีแท่นได้น้ำ ในวันที่ 29, 43 ตามลำดับ

ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอในวันที่ 42 (EL4) ระหว่างกลุ่ม None กับ Water แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ .026 และเมื่อทดสอบทางเดียวพบว่า ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .05 กลุ่ม None ใช้ระยะเวลาในการค้นหาแท่นได้น้ำ มากกว่า กลุ่ม Water อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 (p -value = .013) แสดงว่า กลุ่ม None ใช้เวลาในการเรียนรู้มากกว่ากลุ่ม Water

2) กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None) กับ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR)

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None) กับ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ได้ผลดังตารางที่ 38

ตารางที่ 38 การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม None กับ AAR

		EL4	TTSP3	TTSP4
Mean Rank	None	9.42	7.67	4.33
	AAR	3.58	5.33	8.67
Mann-Whitney U		.500*	11.00	5.00*
Exact Sig.		.002	.310	.041

* นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

EL4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอในวันที่ 42

TTSP3-4 = ระยะเวลารวมทั้งหนูทดลองว่ายวนในโซนที่เคมีแท่นได้น้ำ ในวันที่ 29, 43 ตามลำดับ

ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอในวันที่ 42 (EL4) ระหว่างกลุ่ม None กับ AAR แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ .002 และเมื่อทดสอบทางเดียวพบว่า ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ

.05 กลุ่ม None ใช้ระยะเวลาในการค้นหาแทนได้น้ำ มากกว่า กลุ่ม AAR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .001) แสดงว่า กลุ่ม None ใช้เวลาในการเรียนรู้มากกว่ากลุ่ม AAR

ระยะเวลารวมทั้งหนุทดลองว่ายวนใน โชนที่เคมีแทนได้น้ำวันที่ 43 (TTSP4) ระหว่างกลุ่ม None กับ AAR แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ .041 และเมื่อทดสอบทางเดียวพบว่า ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .05 กลุ่ม AAR ใช้ระยะเวลาว่ายวนใน โชนที่เคมีแทนได้น้ำ มากกว่า กลุ่ม None อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .021) แสดงว่า กลุ่ม AAR สามารถเรียกคืนความจำได้มากกว่ากลุ่ม None

3) กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None) กับ กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil)

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนุทดลองระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None) กับ กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil) ได้ผลดังตารางที่ 39

ตารางที่ 39 การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม None กับ Donepezil

		EL4	TTSP3	TTSP4
Mean Rank	None	7.83	8.75	3.67
	Donepezil	5.17	4.25	9.33
Mann-Whitney U		10.000	4.500*	1.000*
Exact Sig.		.240	.026	.004

* นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

EL4 = ระยะเวลาที่หนุทดลองหาแทนได้น้ำเจอในวันที่ 42

TTSP3-4 = ระยะเวลารวมทั้งหนุทดลองว่ายวนใน โชนที่เคมีแทนได้น้ำ ในวันที่ 29, 43 ตามลำดับ

ระยะเวลารวมทั้งหนุทดลองว่ายวนใน โชนที่เคมีแทนได้น้ำวันที่ 29 (TTSP3) ระหว่างกลุ่ม None กับ Donepezil แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ .026 และเมื่อทดสอบทางเดียวพบว่า ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .05 กลุ่ม None ใช้ระยะเวลาว่ายวนใน โชนที่เคมีแทนได้น้ำมากกว่ากลุ่ม Donepezil อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .013) แสดงว่า กลุ่ม None สามารถเรียกคืนความจำได้มากกว่ากลุ่ม Donepezil

ระยะเวลารวมทั้งหนุทดลองว่ายวนใน โชนที่เคมีแทนได้น้ำวันที่ 43 (TTSP4) ระหว่างกลุ่ม None กับ Donepezil แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ .044 และเมื่อทดสอบทางเดียวพบว่า ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .05 กลุ่ม Donepezil ใช้ระยะเวลาว่ายวนใน โชนที่เคมีแทนได้น้ำ มากกว่า กลุ่ม None อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .002) แสดงว่า กลุ่ม Donepezil สามารถเรียกคืนความจำได้มากกว่ากลุ่ม None

4) กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม (Water) กับ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR)

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองระหว่างกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม (Water) กับ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ได้ผลดังตารางที่ 40

ตารางที่ 40 การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม Water กับ AAR

		EL4	TTSP3	TTSP4
Mean Rank	Water	8.58	5.33	6.00
	AAR	4.42	7.67	7.00
Mann-Whitney U		5.50*	11.00	15.00
Exact Sig.		.041	.310	.699

* นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

EL4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอในวันที่ 42

TTSP3-4 = ระยะเวลารวมทั้งหนูทดลองว่ายวนในโซนที่เคยมึแท่นได้น้ำ ในวันที่ 29, 43 ตามลำดับ

ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอในวันที่ 42 (EL4) ระหว่างกลุ่ม Water กับ AAR แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ .041 และเมื่อทดสอบทางเดียวพบว่า ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .05 กลุ่ม Water ใช้ระยะเวลาในการค้นหาแท่นได้น้ำ มากกว่า กลุ่ม AAR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .021) แสดงว่า กลุ่ม Water ใช้เวลาในการเรียนรู้มากกว่ากลุ่ม AAR

5) กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม (Water) กับ กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil)

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองระหว่างกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม (Water) กับ กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil) ได้ผลดังตารางที่ 41

ตารางที่ 41 การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม Water กับ Donepezil

		EL4	TTSP3	TTSP4
Mean Rank	Water	6.67	7.83	5.92
	Donepezil	6.33	5.17	7.08
Mann-Whitney U		17.000	10.000	14.500
Exact Sig.		.937	.240	.589

* นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

EL4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอในวันที่ 42

TTSP3-4 = ระยะเวลารวมทั้งหนูทดลองว่ายวนในโซนที่เคยมึแท่นได้น้ำ ในวันที่ 29, 43 ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมที่ได้รับ การเหนี่ยวนำอย่างเฉื่อย (Water) กับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil) ในช่วงระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอในวันที่ 42 (EL4) และระยะเวลารวมทั้งหนูทดลองว่ายวนในโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำวันที่ 29, 43 (TTSP3-4) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

6) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) กับ กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil)

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองระหว่างกลุ่มที่ได้รับ สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) กับ กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil) ได้ผลดังตารางที่ 42 ตารางที่ 42 การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระหว่างกลุ่ม AAR กับ Donepezil

		EL4	TTSP3	TTSP4
Mean Rank	AAR	5.50	8.58	6.08
	Donepezil	7.50	4.42	6.92
Mann-Whitney U		12.00	5.50*	15.50
Exact Sig.		.394	.041	.699

* นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

EL4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอในวันที่ 42

TTSP3-4 = ระยะเวลารวมทั้งหนูทดลองว่ายวนในโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำ ในวันที่ 29, 43 ตามลำดับ

ระยะเวลารวมทั้งหนูทดลองว่ายวนใน โซนที่เคยมีแท่นได้น้ำวันที่ 29 (TTSP3) ระหว่างกลุ่ม AAR กับ Donepezil แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ .041 และเมื่อทดสอบทางเฉื่อยพบว่า ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .05 กลุ่ม AAR ใช้ระยะเวลาว่ายวนในโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำมากกว่ากลุ่ม Donepezil อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .021) แสดงว่า กลุ่ม AAR สามารถเรียกคืนความจำ ได้มากกว่ากลุ่ม Donepezil

ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองแต่ละกลุ่มที่ถูกทดสอบด้วย Morris water maze ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ด้วยสถิติ Friedman Test โดยกำหนดสมมติฐานทางสถิติ ดังนี้

H_0 : ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการทดสอบภายในกลุ่มไม่แตกต่างกัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการทดสอบภายในกลุ่มแตกต่างกันอย่างน้อย 1 ช่วง

ตารางที่ 43 ผลการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงระยะเวลา

	ระยะเวลาเฉลี่ย (วินาที)							
	Escape latency: EL				Total time spent in platform: TTSP			
	EL1	EL2	EL3	EL4	TTSP1	TTSP2	TTSP3	TTSP4
Mean Rank	3.25	1.63	2.60	2.52	2.54	2.48	2.63	2.35
Chi-square	19.782*				.587			
Asymp. Sig.	.000				.889			

EL1-4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอในวันที่ 1, 14, 28, 42 ตามลำดับ

TTSP1-4 = ระยะเวลารวมทั้งหนูทดลองว่ายวนในโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำ ในวันที่ 2, 15, 29, 43 ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองในช่วงเวลาที่แตกต่างกันของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม แสดงดังตารางที่ 43 พบว่า ในช่วงระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอ (EL) มีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการทดสอบแตกต่างกันอย่างน้อย 1 ช่วงเวลา ค่าสถิติทดสอบ Chi-square = 19.782, p -value = .000 และไม่พบความแตกต่างในช่วงระยะเวลารวมทั้งหนูทดลองว่ายวนในโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำ (TTSP) ค่าสถิติทดสอบ Chi-square = .587, p -value = .889

เมื่อทดสอบเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองในแต่ละช่วงเวลา เป็นรายคู่ด้วยสถิติ Wilcoxon Signed Ranks Test โดยกำหนดสมมติฐานทางสถิติ ดังนี้

H_0 : ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการทดสอบ ทั้ง 2 ช่วงไม่แตกต่างกัน

H_1 : ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการทดสอบทั้ง 2 ช่วงแตกต่างกัน

1) กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None)

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของหนูทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None) ได้ผลดังตารางที่ 44

ตารางที่ 44 การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม None

	EL2 - EL1	EL3 - EL1	EL4 - EL1	EL3 - EL2	EL4 - EL3
Negative Ranks	3.60	3.33	3.00	5.00	2.25
Positive Ranks	3.00	3.67	3.75	3.20	4.13
Z	-1.572	-.105	-.943	-1.153	-1.261
Asymp. Sig.	.116	.917	.345	.249	.207

EL1-4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอในวันที่ 1, 14, 28, 42 ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองภายในกลุ่มที่ไม่ได้รับการทดลองใดๆ (None) ไม่พบความแตกต่างในแต่ละช่วงเวลา แสดงว่า การเรียนรู้

2) กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมอย่างเฉียบพลัน (Water)

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมอย่างเฉียบพลัน (Water) ได้ผลดังตารางที่ 45

ตารางที่ 45 การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม Water

	EL2 - EL1	EL3 - EL1	EL4 - EL1	EL3 - EL2	EL4 - EL3
Negative Ranks	3.00	3.00	3.80	6.00	4.00
Positive Ranks	6.00	6.00	2.00	3.00	1.50
Z	-.943	-.943	-1.782	-.949	-1.219
Asymp. Sig.	.345	.345	.075	.343	.223

EL1-4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอบนวันที่ 1, 14, 28, 42 ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองภายในกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมอย่างเฉียบพลัน (Water) ไม่พบความแตกต่างในแต่ละช่วงเวลา

3) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR)

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ได้ผลดังตารางที่ 46

ตารางที่ 46 การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม None

	EL2 - EL1	EL3 - EL1	EL4 - EL1	EL3 - EL2	EL4 - EL3
Negative Ranks	3.40	3.50	3.50	5.00	2.88
Positive Ranks	4.00	0.00	0.00	2.50	3.50
Z	-1.363	-2.201	-2.201	-.674	-1.089
Asymp. Sig.	.173	.028	.028	.500	.276

EL1-4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอบนวันที่ 1, 14, 28, 42 ตามลำดับ

ช่วงระยะเวลาที่หนูทดลองหาแท่นได้น้ำเจอบนวันที่ 28 (EL3) เปรียบเทียบกับวันที่ 1 (EL1) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ .028 และเมื่อทดสอบทางเดียวพบว่า ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ

.05 ช่วงเวลาทดสอบวันที่ 28 (EL3) ใช้ระยะเวลาในการค้นหาแทนได้น้ำน้อยกว่าวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .014)

ช่วงระยะเวลาที่หนูทดลองหาแทนได้น้ำเจอในวันที่ 42 (EL4) เปรียบเทียบกับวันที่ 1 (EL1) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ .028 และเมื่อทดสอบทางเดียวพบว่า ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .05 ช่วงเวลาทดสอบวันที่ 42 (EL1) ใช้ระยะเวลาในการค้นหาแทนได้น้ำ น้อยกว่าวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .014)

แสดงว่า ในกลุ่ม AAR มีการเรียนรู้ในวันที่ 28 และ 42 ดีกว่าวันที่ 1

4) กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil)

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของหนูทดลองกลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil) ได้ผลดังตารางที่ 47

ตารางที่ 47 การเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม Donepezil

	EL2 - EL1	EL3 - EL1	EL4 - EL1	EL3 - EL2	EL4 - EL3
Negative Ranks	3.00	3.50	4.67	5.50	3.33
Positive Ranks	6.00	3.50	2.33	3.10	3.67
Z	-.943	-.736	-.734	-1.063	-.105
Asymp. Sig.	.345	.462	.463	.288	.917

EL1-4 = ระยะเวลาที่หนูทดลองหาแทนได้น้ำเจอในวันที่ 1, 14, 28, 42 ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองภายในกลุ่มควบคุมเชิงบวกที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (Donepezil) ไม่พบความแตกต่างในช่วงเวลาใด

ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำในแต่ละช่วงระยะเวลา

จากการเปรียบเทียบผลของพฤติกรรมด้านความรู้และความจำในหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำและสารทดสอบต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในแต่ละช่วงเวลา สามารถสรุปได้ดังนี้

1) ระยะเวลาเฉลี่ยในการหาแทนได้น้ำเจอ (EL) : *ยังใช้เวลา น้อย ถือว่าเรียนรู้ได้ดี*

- กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ มีพฤติกรรมการเรียนรู้ในวันที่ 28 และ 42 ดีกว่าวันที่ 1

- กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ กลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำ และกลุ่มควบคุมเชิงบวก ไม่พบความแตกต่างในช่วงเวลาของการเรียนรู้

2) ระยะเวลารวมทั้งหนุทดลองว่าขวนในโซนที่เคยมึแทนได้น้ำ (TTSP) ไม่พบความแตกต่างใน
ช่วงเวลาของการเรียนรู้



การทดลองที่ 3.2 การตรวจสอบการตายของเซลล์ประสาทและตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิด MCI ในหนูทดลอง

น้ำหนักสมองหนูทดลอง

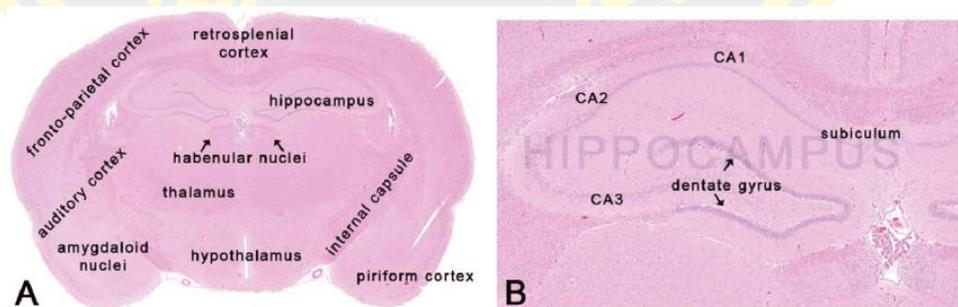
หลังทำการผ่าเปิดกะโหลกหนูทดลอง สมองทั้งหมดถูกนำมาแช่ในน้ำแข็งบดละเอียดทันที ด้วย Ice-cold phosphate buffer saline pH 7.4 ทำการแบ่งสมองซีกซ้ายและซีกขวาออกจากกัน บันทึกค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสมอง ดังตารางที่ 48

ตารางที่ 48 น้ำหนักเฉลี่ยของสมองหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม

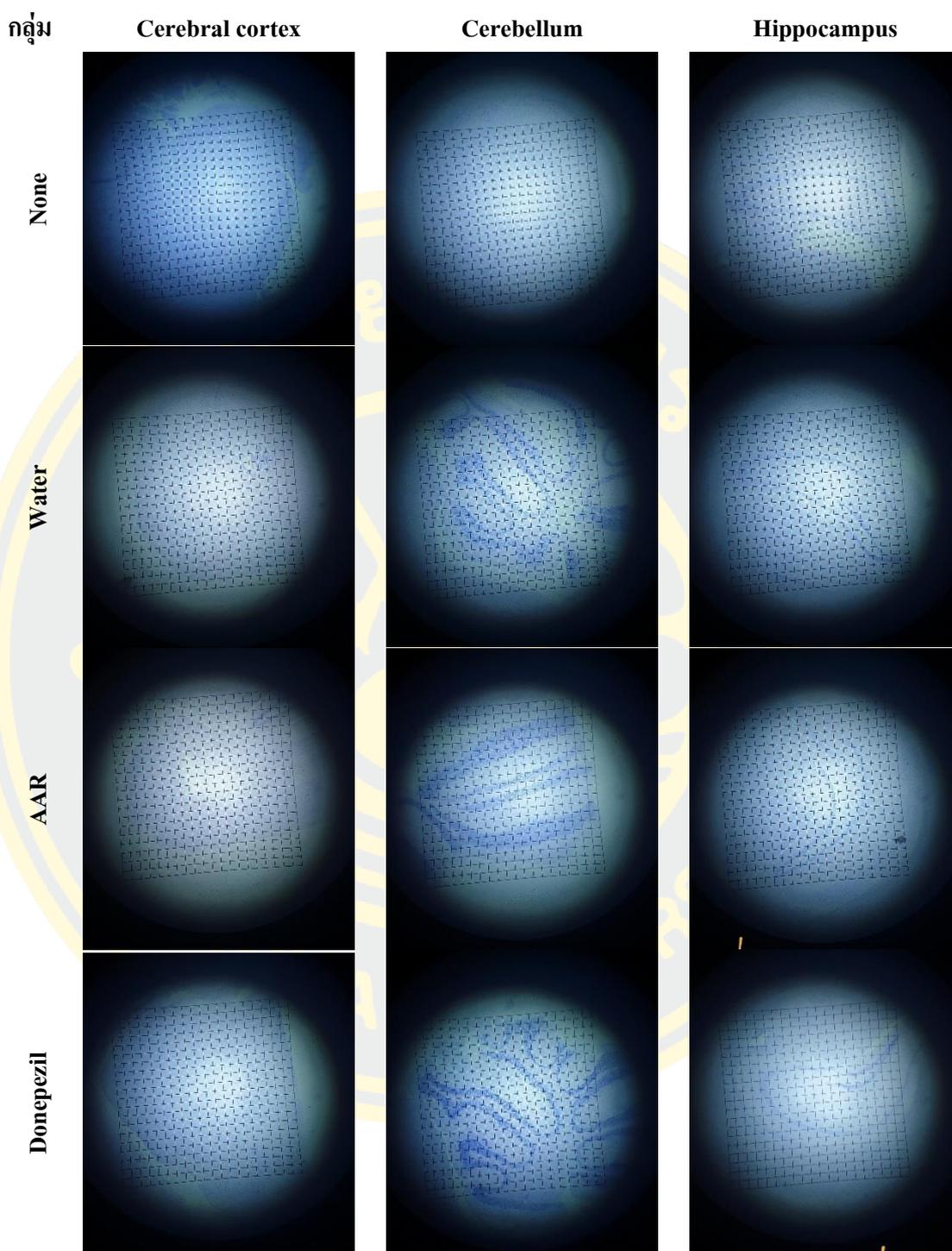
กลุ่ม	น้ำหนักเฉลี่ยของสมองหนู (กรัม)	
	ซีกซ้าย	ซีกขวา
กลุ่มที่ 1 Naïve control (None)	0.148 ± 0.017	0.185 ± 0.012
กลุ่มที่ 2 Control (Water)	0.153 ± 0.018	0.181 ± 0.009
กลุ่มที่ 3 Treatment (AAR)	0.145 ± 0.029	0.183 ± 0.014
กลุ่มที่ 4 Positive control (Donepezil)	0.147 ± 0.027	0.197 ± 0.005

จำนวนเซลล์ประสาทที่ย้อมติดสี H&E

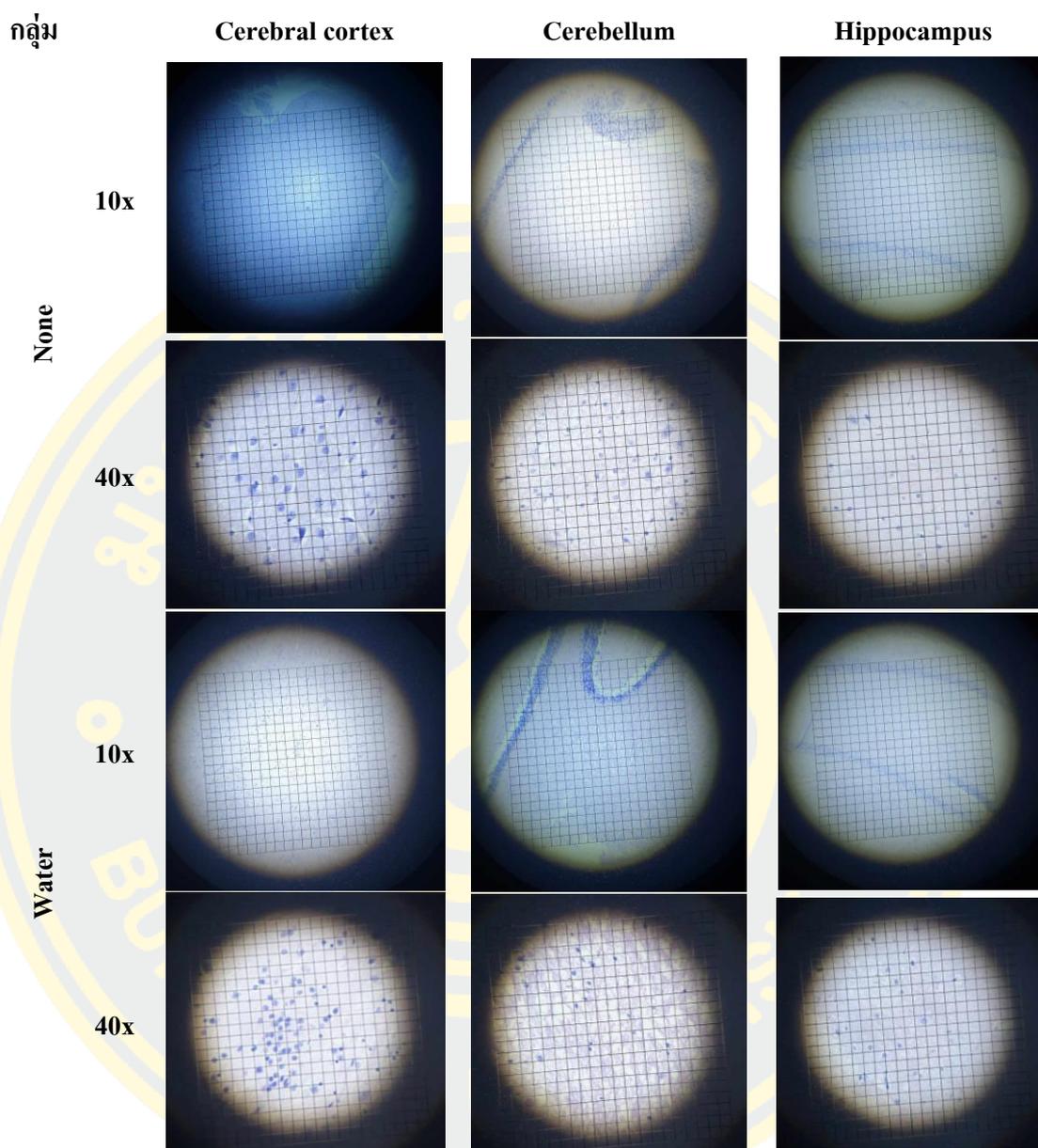
นำสไลด์ที่ย้อมสีด้วย H&E มาทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ประสาทที่ถูกทำลายในสมองแต่ละส่วน ได้แก่ ซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ (Cerebral cortex), ซีรีเบลลัม (Cerebellum), ฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) โดยนับจำนวนเซลล์ประสาทต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ หาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่าร้อยละในแต่ละกลุ่ม



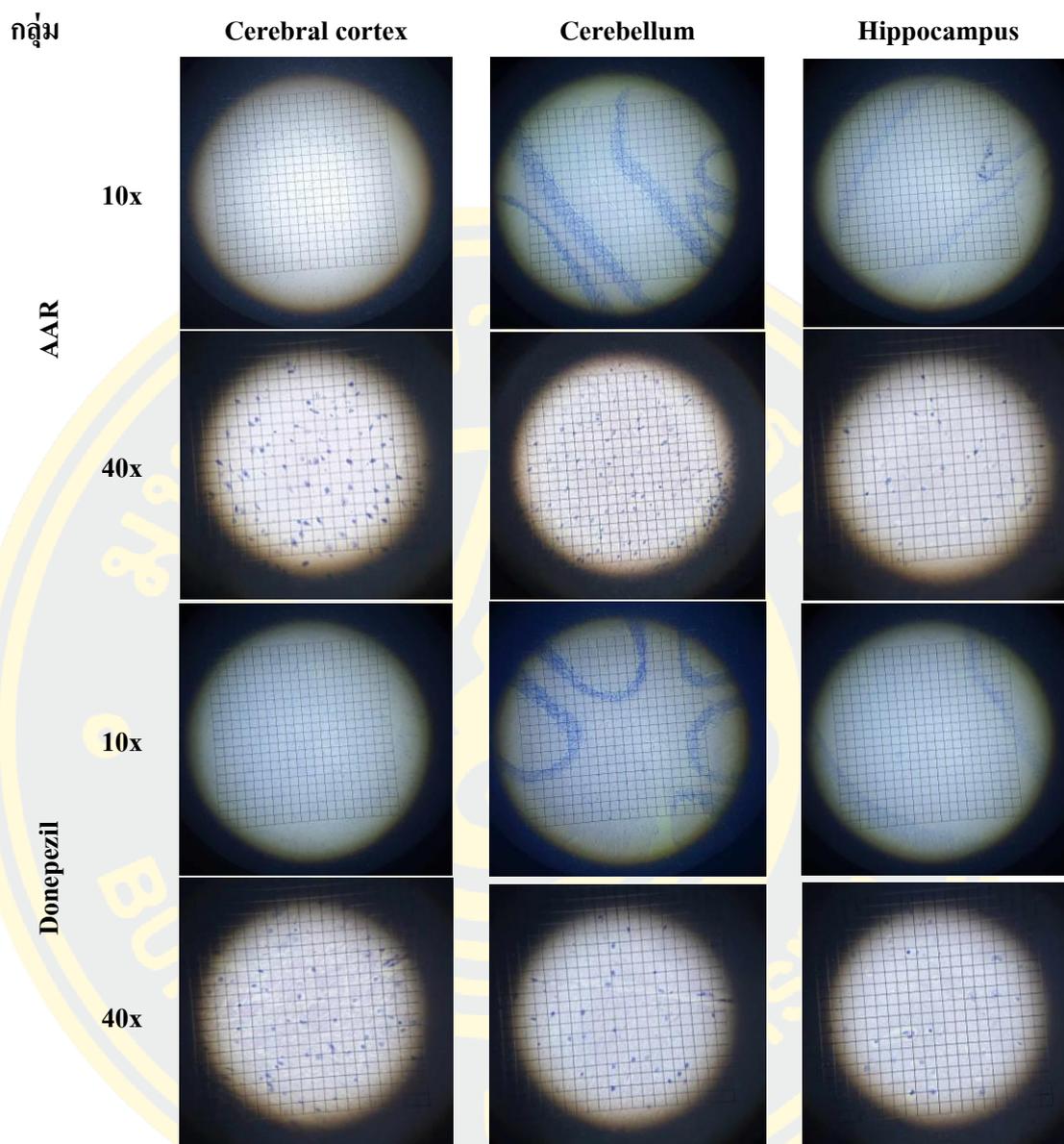
ภาพที่ 40 ภาพตัดขวาง (Transverse section) ของสมองหนู Rat (Rao, Little, & Sills, 2014)



ภาพที่ 41 สมองบริเวณ Cerebral cortex, Cerebellum และ Hippocampus ในหนูทดลองแต่ละกลุ่ม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4x



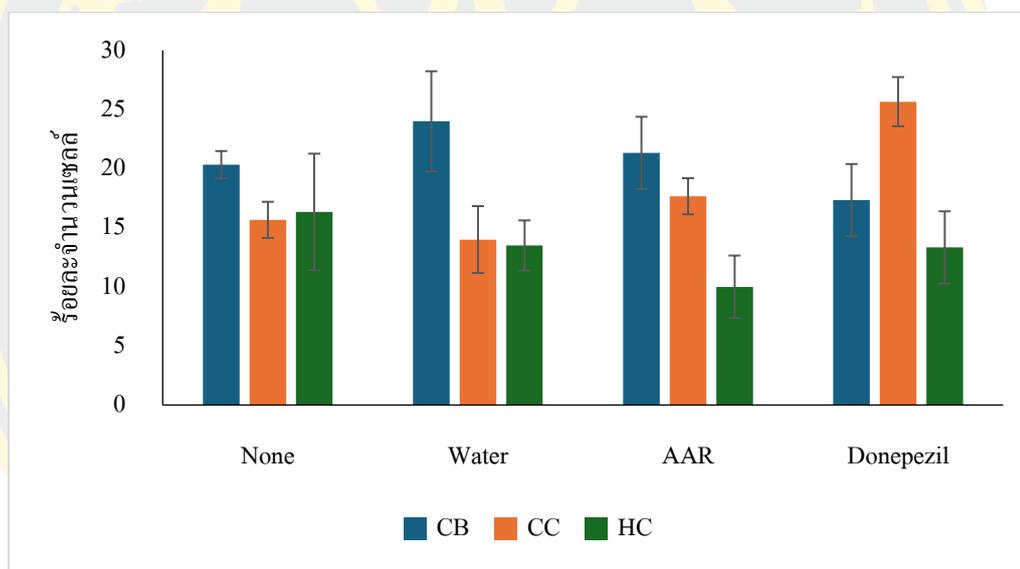
ภาพที่ 42 สมองบริเวณ *Cerebral cortex*, *Cerebellum* และ *Hippocampus* ในหนูทดลอง
 กลุ่ม *None* และ *Water* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 10x และ 40x



ภาพที่ 43 สมองบริเวณ *Cerebral cortex*, *Cerebellum* และ *Hippocampus* ในหนูทดลอง
กลุ่ม AAR และ Donepezil ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10x และ 40x

ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่สมองส่วน Cerebral cortex , Cerebellum และ Hippocampus ในแต่ละกลุ่ม แสดงดังตารางที่ 49
 ตารางที่ 49 ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในสมองแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่		
	Cerebral cortex	Cerebellum	Hippocampus
None	20.333 ± 1.155	15.667 ± 1.528	16.333 ± 4.933
Water	24.000 ± 4.243	14.000 ± 2.828	13.500 ± 2.121
AAR	21.333 ± 3.055	17.667 ± 1.528	10.000 ± 2.646
Donepezil	17.333 ± 3.055	25.667 ± 2.082	13.333 ± 3.055



ภาพที่ 44 ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในหนูแต่ละกลุ่ม

วิเคราะห์เปรียบเทียบร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ระหว่างกลุ่ม ด้วยสถิติ One-way ANOVA พบว่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มของสมองส่วน Cerebral cortex มีค่าสถิติทดสอบ $F = 129.980$, $p\text{-value} = .000$ แสดงว่า มีร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่อย่างน้อย 1 คู่ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 แต่ในสมองส่วน Cerebellum ($p\text{-value} = .136$) และ Hippocampus ($p\text{-value} = .271$) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามตารางที่ 50

ตารางที่ 50 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในแต่ละกลุ่ม

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cerebellum	Between Groups	56.250	3	18.750	2.473	.136
	Within Groups	60.667	20	7.583		
	Total	116.917	23			
Cerebral cortex	Between Groups	226.917	3	75.639	25.213	.000
	Within Groups	24.000	20	3.000		
	Total	250.917	23			
Hippocampus	Between Groups	54.917	3	18.306	1.569	.271
	Within Groups	93.333	20	11.667		
	Total	148.250	23			

* ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ < .05

เมื่อทดสอบร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ระหว่างกลุ่มในสมองส่วน Cerebral cortex เป็นรายคู่ด้วยการเปรียบเทียบแบบพหุคูณ โดยสถิติ LSD พบว่ามี 4 คู่ที่มีร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 ดังตารางที่ 51

ตารางที่ 51 การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของร้อยละจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในสมองส่วน Cerebral cortex แต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	None	Water	AAR	Donepezil
None	-	1.667 (.272)	-1.667 (.272)	-9.667*** (.000)
Water	-	-	-3.333* (.046)	-11.333*** (.000)
AAR	-	-	-	-8.000*** (.000)
Donepezil	-	-	-	-

* ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ < .05

*** ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ < .001

กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None) มีร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในสมอง น้อยกว่า กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .000) โดยผลต่างของความถี่อยู่ที่ 9.667 แสดงว่า กลุ่ม None มีจำนวนเซลล์ที่ติดสีเข้มของเซลล์ และฝ่อ น้อยกว่ากลุ่ม Donepezil

กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมอย่างเฉียบพลัน (Water) มีร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในสมอง น้อยกว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .046) โดยผลต่างของความถี่อยู่ที่ 3.333 แสดงว่า กลุ่ม Water มีจำนวนเซลล์ที่ติดสีเข้มของเซลล์ และฝ่อ น้อยกว่ากลุ่ม AAR

กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมอย่างเฉียบพลัน (Water) มีร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในสมอง น้อยกว่า กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .000) โดยผลต่างของความถี่อยู่ที่ 11.333 แสดงว่า กลุ่ม Water มีจำนวนเซลล์ที่ติดสีเข้มของเซลล์ และฝ่อ น้อยกว่ากลุ่ม Donepezil

กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) มีร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ในสมอง น้อยกว่า กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .000) โดยผลต่างของความถี่อยู่ที่ 8.000 แสดงว่า กลุ่ม AAR มีจำนวนเซลล์ที่ติดสีเข้มของเซลล์ และฝ่อ น้อยกว่ากลุ่ม Donepezil

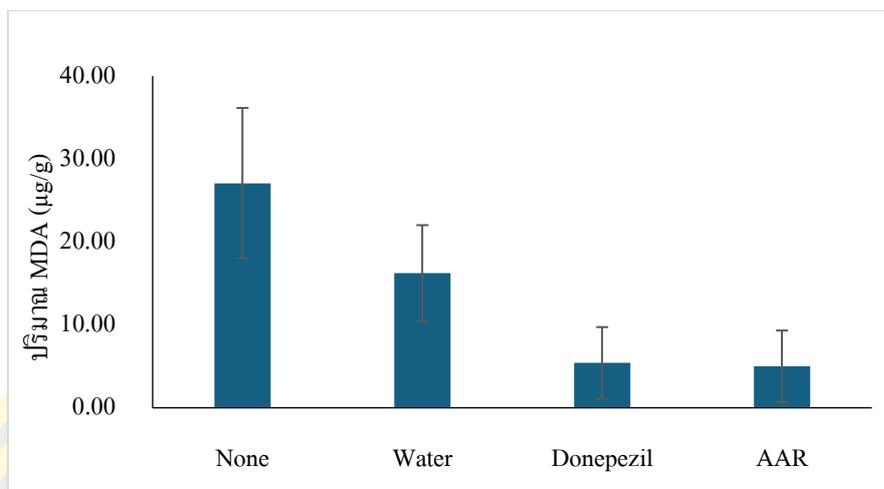
ผลการวิเคราะห์ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) ในสมองหนูทดลอง

- ปริมาณ Malondialdehyde (MDA)

การตรวจสอบปริมาณของ Malondialdehyde (MDA) ในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน Malondialdehyde (MDA) ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ สารมาตรฐาน MDA มีค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงกับความเข้มข้น เป็นกราฟเส้นตรง มีสมการ $y = 0.0024x + 0.0007$ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9997 และเมื่อแทนค่าดูดกลืนแสงลงในสมการ พบปริมาณของ MDA ในเนื้อสมองของหนูแต่ละกลุ่ม ดังตารางที่ 52 และภาพที่ 45

ตารางที่ 52 ปริมาณของ Malondialdehyde (MDA) ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ปริมาณ MDA ในสมอง ($\mu\text{g/g}$ protein)
None	27.083 \pm 9.081
Water	16.250 \pm 5.781
AAR	5.417 \pm 4.320
Donepezil	5.000 \pm 4.320



ภาพที่ 45 ปริมาณ MDA ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณ Malondialdehyde (MDA) ในแต่ละกลุ่ม ด้วยสถิติ One-way ANOVA พบว่า ค่าสถิติทดสอบ $F = 14.344$, $p\text{-value} = .000$ แสดงว่า มีปริมาณ MDA อย่างน้อย 1 กลุ่ม แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 ดังตารางที่ 53

ตารางที่ 53 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ MDA ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1648.220	3	549.407	14.344***	.000
Within Groups	612.847	16	38.303		
Total	2261.068	19			

*** ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $< .001$

เมื่อทดสอบปริมาณ Malondialdehyde (MDA) ในแต่ละกลุ่ม เป็นรายคู่ด้วยการเปรียบเทียบแบบพหุคูณ โดยสถิติ LSD แสดงผลดังตารางที่ 54

ตารางที่ 54 การเปรียบเทียบปริมาณของ MDA ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	None	Water	AAR	Donepezil
None	-	10.833* (.014)	21.667*** (.000)	22.083*** (.000)
Water	-	-	10.833* (.014)	11.250* (.011)
AAR	-	-	-	.417 (.917)
Donepezil	-	-	-	-

* ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $< .05$

*** ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $< .001$

กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None) มีปริมาณของ MDA ในสมอง มากกว่า กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำอย่างเฉียบ (Water) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .014) โดยผลต่างของความถี่อยู่ที่ 10.833 แสดงว่า กลุ่ม None มีปริมาณสารอนุมูลอิสระ MDA ในสมองมากกว่ากลุ่ม Water

กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None) มีปริมาณของ MDA มากกว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .000) โดยผลต่างของความถี่อยู่ที่ 21.667 แสดงว่า กลุ่ม None มีปริมาณสารอนุมูลอิสระ MDA ในสมองมากกว่ากลุ่ม AAR

กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (None) มีปริมาณของ MDA มากกว่า กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .000) โดยผลต่างของความถี่อยู่ที่ 22.083 แสดงว่า กลุ่ม None มีปริมาณสารอนุมูลอิสระ MDA ในสมองมากกว่ากลุ่ม Donepezil

กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำอย่างเฉียบ (Water) มีปริมาณของ MDA มากกว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .000) โดยผลต่างของความถี่อยู่ที่ 10.833 กลุ่ม Water มีปริมาณสารอนุมูลอิสระ MDA ในสมองมากกว่ากลุ่ม AAR

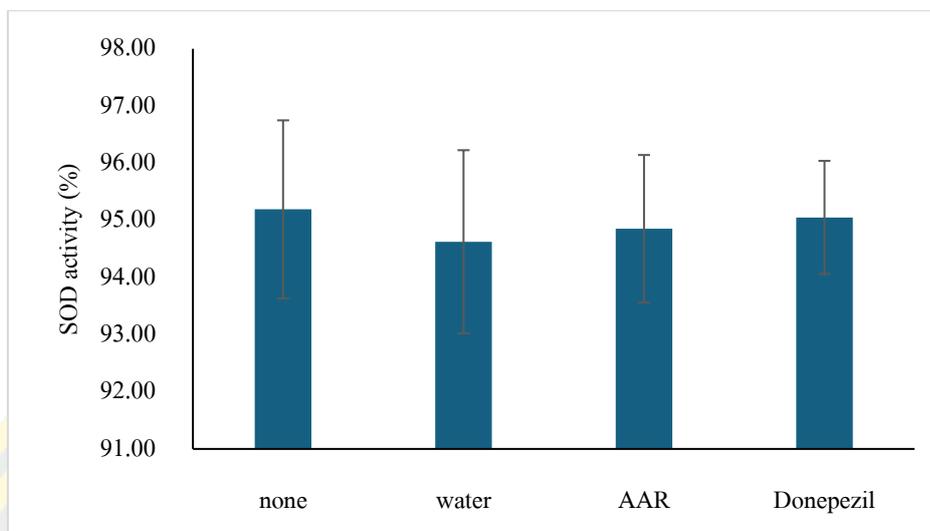
กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำอย่างเฉียบ (Water) มีปริมาณของ MDA มากกว่า กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .011) โดยผลต่างของความถี่อยู่ที่ 11.250 แสดงว่า กลุ่ม Water มีปริมาณสารอนุมูลอิสระ MDA ในสมองมากกว่ากลุ่ม Donepezil

กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) มีปริมาณของ MDA ไม่แตกต่างกับ กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Donepezil) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = .917)

- การทำงานของ Superoxide dismutase (SOD)

การวัดปริมาณการทำงานของ Superoxide dismutase (SOD) โดยใช้ SOD assay kit และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาค่า SOD activity (%) ดังตารางที่ 55 ตารางที่ 55 ปริมาณการทำงานของ SOD ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	SOD activity (%)
None	95.191 ± 1.558
Water	94.624 ± 1.603
AAR	94.851 ± 1.291
Donepezil	95.050 ± 0.990



ภาพที่ 46 ปริมาณ SOD activity (%) ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่า SOD activity (%) ในแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ One-way ANOVA ผลพบว่า ค่าสถิติทดสอบ $F = .306$, $p\text{-value} = .821$ แสดงว่า ไม่พบความแตกต่างของค่า SOD activity (%) ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม แสดงดังตารางที่ 56

ตารางที่ 56 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า SOD activity (%) ในสมองหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	.306	.821
Within Groups	.004	21	.000		
Total	.005	24			

* ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $< .05$

ผลการย้อมติดสีของเซลล์และสารบ่งชี้ทางชีวภาพในสมองหนูทดลอง

จากการเปรียบเทียบเซลล์ประสาทและสารบ่งชี้ทางชีวภาพในสมองหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำและสารทดสอบต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ สามารถสรุปได้ดังนี้

1) จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี H&E ในสมองหนูทดลอง

- กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ มีจำนวนเซลล์ที่ติดสีเข้มและฝ่อลีบ น้อยกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวก
- กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมอย่างเฉียบพลันมีจำนวนเซลล์ที่ติดสีเข้มและฝ่อลีบ น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ และกลุ่มควบคุมเชิงบวก

- กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ มีจำนวนเซลล์ที่ติดสีเข้มของเซลล์และฝ่อลีบ น้อยกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวก

2) ปริมาณของ MDA ในสมองหนูทดลอง: *ยังมีค่ามาก ถือว่าปริมาณอนุมูลอิสระสูง*

- กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ มีปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นในสมองมากกว่ากลุ่มอื่นๆ ทุกกลุ่ม

- กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม มีปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นในสมองมากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ และกลุ่มควบคุมเชิงบวก

- กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ และกลุ่มควบคุมเชิงบวก มีปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นในสมองไม่แตกต่างกัน

3) ปริมาณของ SOD activity ในสมองหนูทดลอง ไม่พบความแตกต่างในสมองของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม



บทที่ 5

สรุปอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

ระยะที่ 1 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยาอายุวัฒนะผ่านโครงข่ายทางเภสัช

วิทยา (Network pharmacology; NP)

ผลของการสร้างโครงข่ายทางเภสัชวิทยา

โครงข่ายทางเภสัชวิทยาของตำรับยาอายุวัฒนะ สำหรับการป้องกัน MCI พบโปรตีนเป้าหมายที่มีค่า degree สูงสุด 10 อันดับแรก ได้แก่ GRB2, SRC, TP53, MAPK1, ESR1, PRKCA, STAT, PIK3R1, FYN และ AKT1 เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Yao et al. (2023) ที่ศึกษาสาร berberine ในการ improving cognitive function ด้วยวิธีการ network pharmacology พบโปรตีนเป้าหมายหลักใกล้เคียงกับการศึกษาของตำรับยาอายุวัฒนะ ได้แก่ Mapk1, Src, Ctnnb1, Akt1, Pik3ca, Tp53, Jun, and Hsp90aa1 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ aging-related cognitive dysfunction และวิถี PI3K-AKT and MAPK pathways และเมื่อทำการทดลองในหนูทดลอง (In vivo) ได้มีการยืนยันว่า Akt1, Ctnnb1, Tp53, and Jun มีส่วนร่วมในการปกป้องเซลล์ประสาท (Yao, Wei, Wen, Cao, & Li, 2023)

ความคิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (Mild Cognitive Impairment: MCI) เป็นระยะการเปลี่ยนผ่านที่เกี่ยวข้องกับอายุ และการลดลงของกระบวนการรู้คิดตามปกติจนถึงระดับรุนแรง ซึ่งบางโปรตีนอาจจะต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ MCI อย่างไรก็ดีตามเมื่อศึกษาในแต่ละโปรตีนเป้าหมายพบหลายประเด็นในการพิจารณา ดังนี้

Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) เป็นโปรตีนตัวปรับ (adaptor protein) ที่จับเข้ากับ the epidermal growth factor receptor (EGFR) มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) การอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) และ ความสามารถในการเชื่อมต่อกระแสประสาท (synaptic plasticity) นอกจากนั้นยังมีปฏิสัมพันธ์กับ receptor tyrosine kinases (RTKs) ซึ่งมีส่วนร่วมด้วย EGFR ในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ การเพิ่มขึ้นของปฏิสัมพันธ์ระหว่าง GRB2-NOX4 (NADPH Oxidase 4) มีบทบาทในการป้องกันการแยกชิ้นส่วนของโครงสร้างภายในเซลล์ (cytoskeletal) ปิดกั้นการทำงานของ nitrogen oxides และลดการแสดงออกของโปรตีน slingshot homolog 1 (SSH-1) ที่กระตุ้นให้เกิดการแยกชิ้นส่วนของ cytoskeletal ในสภาวะที่เสมือนโรคอัลไซเมอร์ (Majumder, Roy, Singh, Jana, & Mukhopadhyay, 2017) นอกจากนั้นยังพบความเข้มข้นของ GRB2 ใน neuronal cell bodies ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วย AD นำไปสู่การถูกกักเก็บของ abetaPP และ

abetaPP intracellular domain (AICD) ที่มากขึ้น ส่งผลต่อการหมุนเวียนโดยการปล่อยถุงขนาดเล็ก (exosomal vesicles) ออกนอกเซลล์และทำให้ระดับของ abetaPP and AICD ในเซลล์เพิ่มขึ้น (Raychaudhuri & Mukhopadhyay, 2010)

SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase (SRC) เป็นยีนที่มีบทบาทในการควบคุมการพัฒนาของตัวอ่อน (embryo development) และการเติบโตของเซลล์ (cell growth) ที่เกี่ยวข้องกับ การส่งสัญญาณของเซลล์ประสาท (neuronal signaling), การส่งผ่านกระแสประสาท (synaptic plasticity), และการอยู่รอดของเซลล์ประสาท (neuronal survival) จากการศึกษาหนูที่มีภาวะ ischemic brain แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของกระบวนการสร้างพลังงาน ATP (phosphorylation) ของยีน SRC ในเซลล์ไมโครเกลีย (microglia cell) ที่ถูกกระตุ้นในสมองส่วน hippocampus ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการกระบวนการอักเสบในระบบประสาท (neuroinflammatory) และทำงานของ microglial cell (Choi et al., 2005)

Tumor protein p53 (TP53) หรือยีนต้านเนื้องอก ทำหน้าที่สร้างโปรตีน p53 ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการซ่อมแซมส่วนของพันธุกรรมที่เสียหาย (DNA damage) และมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีความผิดปกติไม่ให้เกิดการแบ่งตัว โดยโปรตีนที่เข้ารหัสจะตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์ที่หลากหลายเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ดังนั้นจึงกระตุ้นการจับกุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle regulation) การตายแบบอะพอพโทซิส (apoptotic cell death) การแก่ชรา (aging) การซ่อมแซม DNA (DNA repair) หรือการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิซึม (metabolic changes) หาก p53 เกิดการเสียหายรุนแรง จะกระตุ้นการ apoptosis ถ้ายีนเหล่านี้มีการกลายพันธุ์จนไม่สามารถสร้างได้ จะทำให้กลไกการป้องกันการเกิด malignancy ลดลง การแสดงออกของโปรตีน p53 ในสมองส่วน cerebral cortex ที่เรียกว่า the inferior parietal lobule (IPL) ในผู้ป่วย mild cognitive impairment (MCI) และ Alzheimer's disease (AD) มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งชักนำโปรตีนทำให้เกิดการตาย (pro-apoptotic protein) (Cenini, Sultana, Memo, & Butterfield, 2008) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อพยากรณ์โรคในระยะเวลาในผู้ป่วยที่เป็น MCI to AD โดยใช้การวิเคราะห์ไซโตฟลูออโรเมตริกของ p53 (cytofluorometric analysis of unfolded p53) พบว่าระดับโปรตีนที่สูงขึ้นสามารถแยกแยะและทำนายผู้ป่วย MCI ไปยัง AD ได้ (Stanga, Lanni, Sinfioriani, Mazzini, & Racchi, 2012) การแสดงออกของ p53 ที่เพิ่มขึ้นทั้งในพลาสมาและเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocytes) มีความเกี่ยวข้องกับ MCI (Salech et al., 2017) (Amor-Gutiérrez et al., 2020) นอกจากนี้ยังมีการรายงานที่ TP53 มีปฏิสัมพันธ์กับ amyloid-beta (A β) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของแอมิลอยด์พลาแก (amyloid plaques) ซึ่งพบในผู้ป่วย AD เห็นได้ว่า

TP53 อาจส่งผลกระทบต่อการสะสมและความเป็นพิษของ A β และนำไปสู่การเกิด cognitive impairment ได้

Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1) หรือ Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) เป็นสมาชิกของกลุ่มโปรตีนไคเนสที่กระตุ้นการทำงานของไมโทเจน (MAPK) ที่ควบคุมสัญญาณภายนอกเซลล์ (ERKs) ทำหน้าที่เป็นจุดรวมสำหรับสัญญาณทางชีวเคมีหลายชนิด MAPK1 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ รวมถึงการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) การแยกความแตกต่าง (differentiation) การอยู่รอด (survival) และความสามารถในการเชื่อมต่อกระแสประสาท (synaptic plasticity) การส่งสัญญาณ MAPK1 มีความเกี่ยวข้องกับ long-term potentiation (LTP) ซึ่งเป็นกระบวนการระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเชื่อมต่อกระแสประสาท (synaptic plasticity) และการสร้างหน่วยความจำ (memory formation) มีการคาดการณ์ว่าการยับยั้งการแสดงออกของ MAPK1 สามารถปรับปรุงการทำงานของกระบวนการรู้คิดได้ รวมถึงปรับปรุงการอัตราการตายของ cell apoptosis rates ที่เพิ่มขึ้น, การเพิ่มของระดับ AChE, iNOS, ROS, MDA, MAPK1 และ p-MAPK1 และสามารถลดระดับของ SOD, GSH-Px และ miR-132 เพื่อปรับปรุงการทำงานทางปัญญาของหนูที่มี AD ซึ่งเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับ MAPK pathway โดยมีความสัมพันธ์ในการยับยั้งเป้าหมายระหว่าง microRNA (miR)-132 และ MAPK1 (Deng et al.(Deng et al., 2020)

Estrogen receptor 1 (ESR1) หรือเรียกว่า Estrogen receptor alpha (ER α) ซึ่งเป็น โปรตีนรีเซพเตอร์นิวเคลียร์ (nuclear receptor protein) ที่จับกับฮอร์โมนเอสโตรเจน มีบทบาทในการเจริญเติบโต การเผาผลาญอาหาร พัฒนาการทางเพศ การตั้งครรภ์ และการทำงานของระบบสืบพันธุ์ รวมไปถึงแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น สมอง ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการเป็นสื่อกลางจากผลของฮอร์โมนเอสโตรเจน ฮอร์โมน Estrogen และการส่งสัญญาณ ESR1 มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันระบบประสาท (neuroprotective effects) โดยส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ประสาท (neuronal survival), ลดการอักเสบของระบบประสาท (neuroinflammation) และเพิ่มความสามารถในการเชื่อมต่อกระแสประสาท (synaptic plasticity) โดยเอสโตรเจนมีผลป้องกันในระบบประสาทส่วนกลาง ผ่านกลไกการออกฤทธิ์ที่มีสื่อกลางเป็น estrogen receptors (ERs) (Elcoroaristizabal Martín et al., 2011) ส่งผลกระทบต่อการทำงานภายในสมอง ความสามารถในการเชื่อมต่อกระแสประสาท (synaptic plasticity), การปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotection), และ (neurotrophic signaling pathways) รวมถึงความจำ (memory) ความสนใจ (attention) และกระบวนการคิดระดับสูง (executive function) เกี่ยวข้องกับกระบวนการรู้คิด นอกจากนี้มีรายงานว่าระดับฮอร์โมนเอสโตร

เจนที่ลดลงในช่วงวัยหมดประจำเดือน และการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนนี้เชื่อมโยงกับการลดลงของความรู้ความเข้าใจ

Protein kinase C alpha (PRKCA) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในตระกูล protein kinase C (PKC) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการการถ่ายโอนสัญญาณ (signal transduction) การเติบโตของเซลล์ (cell growth) การแยกส่วน (differentiation) และความสามารถในการเชื่อมต่อกระแสประสาท (synaptic plasticity), การยึดเกาะของเซลล์ (cell adhesion) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ จุดตรวจวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle control) และการควบคุมปริมาณเซลล์ (cell volume regulation) PRKCA เกี่ยวข้องกับเส้นทางการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signaling pathways) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ long-term potentiation (LTP) มีการควบคุมการส่งผ่านกระแสประสาท (synaptic plasticity), การส่งสัญญาณแบบไซแนปติก (synaptic transmission) และการสร้างหน่วยความจำ (memory formation)

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) เป็นสมาชิกที่อยู่ในตระกูลโปรตีน STAT โดย STAT3 เกี่ยวข้องกับการควบคุมการตอบสนองของภูมิคุ้มกันและการอักเสบในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) สามารถเปิดใช้งานเพื่อตอบสนองต่อไซโตไคน์และปัจจัยการเจริญเติบโตต่าง ๆ (various cytokines and growth factors) ซึ่งเกี่ยวข้องกับหน้าที่ของ pro-inflammatory และ anti-inflammatory เช่น IFNs, EGF, IL5, IL6, HGF, LIF และ BMP2 ด้วยเหตุนี้จึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ เช่น การเติบโตของเซลล์และการตายของเซลล์ (R. Pal, Tiwari, Nath, & Pant, 2016) รวมไปถึงยังเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial function) และกลไกการป้องกันสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant defense mechanisms) การส่งสัญญาณ STAT3 ที่ควบคุมไม่ได้อาจรบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรียและเพิ่มความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งอาจนำไปสู่การเสื่อมของระบบประสาทและการลดลงของความรู้ความเข้าใจ การควบคุมการแสดงออกของโปรตีน STAT3, VEGF และ VEGF receptor 2 ในหนูที่เป็นโรคหลอดเลือดสมองขนาดเล็กด้วยสาร salvianolic acid B ส่งผลต่อการบกพร่องทางสติปัญญา (cognitive deficits) และการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ในโรคหลอดเลือดสมองขนาดเล็ก (cerebral small vessel disease) (W. Wang & Hu, 2018) นอกจากนี้ STAT3 ยังเป็นสื่อกลางในการผลิตความเครียดออกซิเดชันของหลอดเลือด ส่งผลกระทบต่อ parenchymal and vascular amyloid pathology ในทำงานของหลอดเลือดสมอง (Mehla et al., 2021)

Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1) เป็นหน่วยย่อยควบคุมของ phosphoinositide-3-kinase (PI3K) ซึ่ง PI3K signaling pathway มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ เช่น การเติบโตของเซลล์ (cell growth) การอยู่รอด (survival) เมแทบอลิซึม

(metabolism) และความสามารถในการเชื่อมต่อกระแสประสาท (synaptic plasticity) รวมไปถึงมีบทบาทในการปรับการอักเสบ (modulating inflammation) และการตอบสนองต่อความเครียด ออกซิเดชันในสมอง นำไปสู่การเกิดการอักเสบของระบบประสาท (neuroinflammation) โดย PI3K เป็นองค์ประกอบหลักในเส้นทางการส่งสัญญาณอินซูลิน (the insulin signaling pathway) ซึ่งมีความสำคัญต่อการเผาผลาญกลูโคสและการควบคุมพลังงาน นอกจากนี้ PI3K ยังมีบทบาทสำคัญในการเผาผลาญอินซูลิน และการกลายพันธุ์ของยีนนี้เกี่ยวข้องกับการดื้อต่ออินซูลิน การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและโปรตีน (PPI) เผยให้เห็นวิถีโปรตีนฮับ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PTEN, PI3K และ mTOR มีส่วนเกี่ยวข้องร่วมกันในเส้นทางการส่งสัญญาณ mTOR ซึ่งการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงจะเพิ่ม the phosphorylation of PTEN proteins และอาจส่งผลต่อการทำงานของสมองในหนูที่เป็นโรคอ้วน (Chen, Ma, Zhao, Pan, & Chen, 2023)

FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase (FYN) เป็นสมาชิกของ the Src family of protein kinases (SFKs) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องในการทำงานที่สำคัญหลายอย่างในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) รวมถึงไมอีลิเนชัน (myelination) และการส่งผ่านซินแนปติก (synaptic transmission) โดย FYN แสดงออกอย่างเด่นชัดในระบบประสาทส่วนกลางและมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเซลล์ประสาท (neuronal development) ทั้งการก่อตัว (synapse formation), การโตเต็มวัย (maturation), และการบำรุงรักษา (maintenance) การส่งผ่านกระแสประสาท (synaptic plasticity) และการถ่ายโอนสัญญาณ (signal transduction) นอกจากนี้ FYN ยังมีส่วนเกี่ยวข้องใน phosphorylation ของโปรตีนเทา (tau protein) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของการพันกันของเส้นใยประสาท (neurofibrillary tangles) ที่พบได้ใน Alzheimer's disease (AD) และ MCI บางกรณี ความผิดปกติของ FYN เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางพยาธิสภาพที่พบในโรคเกี่ยวกับความเสื่อมของระบบประสาท เช่น AD โดยเกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ประสาท (demyelination) การรวมตัวของโปรตีนทางพยาธิวิทยา (protein aggregation) การอักเสบของระบบประสาท (neuroinflammation) และความผิดปกติของการรู้คิด (cognitive dysfunction) (Guglietti, Sivasankar, Mustafa, Corrigan, & Collins-Praino, 2021) รวมถึงการสูญเสียความสามารถในการเชื่อมต่อกระแสประสาท (synaptic plasticity) (Mahaman, Huang, Embaye, Wang, & Zhu, 2021) และอาจนำไปสู่การเกิดเมแทบอลิซึมที่ผิดปกติของ tau protein (tau hyperphosphorylation)

AKT serine/threonine kinase 1 (AKT1) หรือเรียกว่า protein kinase B alpha (PKB α) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในเส้นทางการส่งสัญญาณของ phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการเติบโตของเซลล์ รวมถึงการอยู่รอดของเซลล์ การเพิ่มจำนวน เมแทบอลิซึม และซินแนปติกพลาสติก โดยส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์โดยการยับยั้งการตายของ

เซลล์ (inhibiting apoptosis) และควบคุมการทำงานของซินแนปติก (synaptic function) และความเป็นพลาสติก (plasticity) ผ่านการมอดูเลตของตัวรับสารสื่อประสาท (neurotransmitter receptors) และเส้นทางการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signaling pathways) AKT1 เป็นองค์ประกอบสำคัญของเส้นทางการส่งสัญญาณอินซูลิน (the insulin signaling pathway) ซึ่งควบคุมการเผาผลาญกลูโคสและสถานะสมดุลของพลังงาน (energy homeostasis) นอกจากนี้ AKT1 signaling pathway ยังเกี่ยวข้องกับการปรับการตอบสนองของการอักเสบของระบบประสาท (neuroinflammation) และความเครียดออกซิเดชันในสมอง มีการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในฮิปโปแคมปัสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากการปรับสภาพด้วย สาร puerarin สังกัดจากระดับของ phosphorylated Akt1, GSK-3 β และ MCL-1 นั้นสูงขึ้น และระดับของ cleaved-caspase-3 ลดลงผ่านการเปิดใช้งาน PI3K/Akt1/GSK-3 β /MCL-1 signaling pathway (Tao et al., 2017) และ AKT1 ยังมีความเกี่ยวข้องในกระบวนการ the endothelial PTEN/Akt pathway ซึ่งจะเพิ่มการแสดงออกของ monocarboxylic acid transporter 1 (MCT1) ในการเพิ่มการขนส่งแลคเตททั่ว endothelium ของสมอง มีความสำคัญในฐานะเป็นแหล่งพลังงานและโมเลกุลส่งสัญญาณ (signaling molecule) (J. Wang et al., 2019)

นอกจากนั้น โปรตีนที่ได้ยังมีความเชื่อมโยงกับกลุ่มสารประกอบที่มีค่า degree 10 อันดับแรก ได้แก่ (2R)-1-(Propan-2-Ylamino)-3-(2-Prop-2-Enylphenoxy)Propan-2-Ol, Alprenolol, Linoleic Acid, (S)-Verapamil, (2Z,4Z)-5-(1,3-Benzodioxol-5-Yl)-1-Piperidin-1-Ylpenta-2,4-Dien-1-One, (R)-Verapamil, (S)-Alprenolol, Piplartine, Magnolol และ Obovatol อีกด้วย

ผลของวิถีที่มีนัยสำคัญ

วิถีที่มีนัยสำคัญ (significant pathways) ของสารประกอบตำรับยาอายุวัฒนะพบทั้งหมด 37 pathways ซึ่งเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการทางชีวภาพ ได้แก่

1) กระบวนการประมวลผลข้อมูลจากสิ่งแวดล้อม (Environmental Information Processing) ประกอบด้วย signal transduction ซึ่งเป็นกระบวนการส่งทอดสัญญาณเข้า เกิดจากได้รับปัจจัยภายนอกกระตุ้นแล้วส่งสัญญาณผ่านการทำงานของโมเลกุลต่างๆ ภายใน นำไปสู่การตอบสนองของเซลล์ และ signaling molecules and interaction เป็นการส่งสัญญาณและอันตรกริยาโดยพบวิถีดังนี้

ErbB signaling pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่ควบคุมการตอบสนองทางชีววิทยาต่างๆ การเพิ่มจำนวน (proliferation), ความแตกต่าง (differentiation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell motility) และการอยู่รอด (survival)

VEGF signaling pathway เกี่ยวข้องกับการตอบสนองใน endothelial cells และเป็นตัวแปลงสัญญาณที่สำคัญในการสร้างหลอดเลือดทั้งทางสรีรวิทยา (physiologic) และทางพยาธิวิทยา (pathologic) ซึ่งการจับกันระหว่าง VEGF กับ VEGFR-2 นำไปสู่การส่งสัญญาณที่แตกต่างกันเป็นผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวน (proliferation) และการกระจาย (migration) ของ endothelial cells และส่งเสริมการอยู่รอด (survival) และการซึมผ่านของหลอดเลือด (vascular permeability)

Calcium signaling pathway สัญญาณของ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์ เป็นแหล่งสัญญาณที่สำคัญ โดยสามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ด้วย a large electrochemical gradient ที่อยู่ที่ทั่ว plasma membrane ทำให้เกิดการเปิดใช้งานช่องสัญญาณขาเข้าของช่องทางต่างๆ

Neuroactive ligand-receptor interaction เป็นปฏิสัมพันธ์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ประสาท โดยการจับกับตัวรับภายในเซลล์ ซึ่งมีความสามารถในการจับปัจจัยการถอดความและควบคุมการแสดงออกของยีน การรบกวนยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการนี้จะส่งผลให้การทำงานของหน่วยความจำลดลง

2) การเกิดโรคในมนุษย์ (Human Diseases) มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง (Cancer) เป็นส่วนใหญ่ และยังมีโรคที่เกี่ยวข้องกับ infectious disease และ endocrine and metabolic disease มะเร็ง (Cancer) เกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การได้รับสารกระตุ้นจากทั้งภายในและภายนอกร่างกาย การขาดการซ่อมแซมสารพันธุกรรมที่เสียหาย การกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโต รวมถึงการติดเชื้อ เป็นต้น ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเรียนรู้ต่างๆ

โรคติดเชื้อ (Infectious disease) การติดเชื้อทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง อาจมีส่งผลต่อกระบวนการรู้คิด ซึ่งการติดเชื้อทั้ง 2 แบบมีกลไกการทำงานร่วมกัน เมื่อรวมกับปัจจัยเสี่ยงที่พบในผู้สูงอายุที่มีภูมิคุ้มกันที่เสื่อมลง ยังมีส่วนเพิ่มความเสี่ยงของภาวะการรู้คิดที่ลดลง และการเกิดภาวะสมองเสื่อม (Hernandez-Ruiz et al., 2022) การติดเชื้อ helicobacter pylori infection จะกระตุ้นให้นิวโทรฟิลหลัง ROS ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อสารพันธุกรรมได้ และพบว่ามีส่วนทำให้เกิดพยาธิสรีรวิทยาของ MCI บางส่วนจากทฤษฎีนี้ทำให้เกิดภาวะอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic atrophic gastritis) (Kountouras et al., 2007)

โรกระบบต่อมไร้ท่อและการเผาผลาญในเซลล์ (Endocrine and metabolic disease) เป็นกลุ่มโรคที่เกี่ยวข้องกับต่อมไร้ท่อและความผิดปกติในการสันดาป นำไปสู่การเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type II diabetes mellitus) ซึ่งกระบวนการรู้คิดที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับการควบคุมน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ไม่สามารถควบคุมน้ำตาลได้ และยังสัมพันธ์กับระยะเวลาการเป็นโรคที่นานขึ้น (Alkethiri et al., 2021)

3) กระบวนการสัณดาป (Metabolism) เป็นกระบวนการเผาผลาญและเปลี่ยนแปลงสารอาหารที่เข้าสู่ร่างกายให้เป็นพลังงาน เพื่อนำไปใช้ในการทำกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์

Lipid metabolism เป็นกระบวนการสังเคราะห์และสลายของลิพิดภายในเซลล์ ซึ่งไขมันมีความสำคัญในการรักษาการทำงานของสมอง ในสมองของผู้สูงอายุและผู้ป่วย AD มีการเปลี่ยนแปลงของ lipid profiles อาการทางพยาธิสภาพที่สำคัญของภาวะเหล่านี้เชื่อมโยงกับการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิซึมของไขมัน

Linoleic acid metabolism เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงในเมแทบอลิซึมของ UFA มีข้อมูลถึงการก่อการกระบวนการเมแทบอลิซึมและการแสดงลักษณะเฉพาะทางพยาธิวิทยาใน AD ภายใน middle frontal gyrus พบการลดลงของ linoleic acid, linolenic acid, and arachidonic acid และการเพิ่มขึ้นของ docosahexanoic acid อาจแสดงให้เห็นถึงขีดจำกัดของระดับสาร metabolites ที่สะสมในส่วน of สมอง (Snowden et al., 2017)

Arachidonic acid metabolism เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เมื่อเซลล์เกิดอันตรายจะเกิดการกระตุ้นเอ็นไซม์ phospholipase ทำให้เกิดการย่อย phospholipid ของเยื่อหุ้มเซลล์ และปลดปล่อย arachidonic acid (AA) ออกมา ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดหนึ่ง จากนั้น AA จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นสารสื่อกลางที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการอักเสบในหลายกระบวนการ

Steroid hormone biosynthesis เป็นกระบวนการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลพวกสเตียรอยด์ฮอร์โมน ซึ่งถูกสังเคราะห์มาจากคอเลสเตอรอล (cholesterol) แล้วเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง โดยจะเปลี่ยนแปลงด้วยเอ็นไซม์ที่ต่างกันแต่ละชนิดและเนื้อเยื่อนั้นๆ

Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 เป็นกระบวนการย่อยสลายสารแปลกปลอม (xenobiotics) ทางธรรมชาติ ผ่านกระบวนการออกซิเดชัน รีดักชัน และ ไฮโดรไลซิส นำไปสู่การกำจัดออกทางไตได้ง่ายขึ้นด้วยเอ็นไซม์ cytochrome P450

4) ระบบอวัยวะ (Organismal Systems) ระบบต่างๆ ของร่างกายแบ่งได้หลายระบบ เช่น ระบบการไหลเวียน (circulatory system) ซึ่งเกี่ยวข้องกับหลอดเลือดภายในร่างกาย ระบบขับถ่ายของเซลล์ (excretory system) ระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine system) ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) และ ระบบประสาท (nervous system) มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการรู้คิด

Vascular smooth muscle contraction มี vascular smooth muscle cells (VSMCs) เป็นตัวควบคุมหลักของ cerebrovascular dynamics ในการตอบสนองต่อความต้องการออกซิเจนและสารอาหารของสมอง ซึ่งความยืดหยุ่น (plasticity) ของ VSMCs มีบทบาทสำคัญในกระบวนการที่ซับซ้อนของ neurodegeneration (Hayes et al., 2022)

Aldosterone-regulated sodium reabsorption เป็นระบบที่ถูกควบคุมโดยฮอร์โมน aldosterone จาก glomerulosa cells ใน adrenal cortex มีหน้าที่ควบคุมการตอบสนองทางสรีรวิทยาที่หลากหลาย รวมถึงการตอบสนองต่อความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress) การอักเสบ (inflammation) การหยุดชะงักของของเหลว (fluid disruption) และความดันโลหิตที่ผิดปกติ ผ่านการกระทำต่อเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ไต หัวใจ และระบบประสาทส่วนกลาง (Tsilosani, Gao, & Zhang, 2022)

Renin-angiotensin system เป็นระบบ peptidergic ที่มีลักษณะของต่อมไร้ท่อ ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมความดันโลหิตและความสมดุลของอิเล็กโทรไลต์ (hydro-electrolytic balance)

Adipocytokine signaling pathway ปริมาณและจำนวน adipocyte ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการผลิต leptin ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่สำคัญของการได้รับพลังงานและอัตราการเผาผลาญ โดยจะออกฤทธิ์ที่ hypothalamic nuclei และสัมพันธ์เชิงลบกับการผลิต adiponectin ซึ่งช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดและ FFAs

GnRH signaling pathway การหลั่งฮอร์โมน gonadotropin-releasing (GnRH) จากไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ต่อรีเซพเตอร์ในต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary) เพื่อควบคุมการผลิตและการปล่อยฮอร์โมน gonadotropins, LH และ FSH

PPAR signaling pathway คือ peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) เป็นตัวรับฮอร์โมนนิวเคลียร์ที่เปิดใช้งานโดยกรดไขมันและอนุพันธ์

Insulin signaling pathway อินซูลินจับกับตัวรับของมันส่งผลให้เกิดไทโรซีนฟอสโฟรีเลชันของสารตั้งต้นตัวรับอินซูลิน (IRS) โดยตัวรับอินซูลินไทโรซีนไคเนส (INSR) ซึ่งช่วยให้สามารถเชื่อมโยง IRS กับหน่วยย่อยของ phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ได้

Progesterone-mediated oocyte maturation เป็นกระบวนการสุกของเซลล์ไข่

Fc epsilon RI signaling pathway เส้นทางการส่งสัญญาณที่อาศัย RI ของ Fc epsilon ใน mast cells เริ่มต้นโดยอันตรกิริยาของแอนติเจน (Ag) กับ IgE ที่จับกับโดเมนนอกเซลล์ของสายโซ่อัลฟาของ Fc epsilon RI (alpha chain of Fc epsilon RI) เส้นทางการทำงานถูกควบคุมด้วยปฏิสัมพันธ์ของสัญญาณในโมเลกุลจำนวนมาก

T cell receptor signaling pathway การทำงานของ T lymphocytes เป็นเหตุการณ์สำคัญในการตอบสนองอย่างมีประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งทำงานร่วมกับ T-cell receptor (TCR) และโมเลกุลเสริม (costimulatory molecule)

B cell receptor signaling pathway B cells เป็นองค์ประกอบสำคัญของภูมิคุ้มกันแบบปรับตัว โดยที่การผลิตและหลั่ง antibody molecules จำนวนมาก ซึ่งแต่ละโมเลกุลจะจดจำแอนติเจนที่แตกต่างกัน

Long-term potentiation เป็นพื้นฐานระดับโมเลกุลสำหรับการเรียนรู้และความจำ ซึ่งเพิ่มประสิทธิภาพการสื่อสาร (synaptic) ในระยะยาว ในทางตรงกันข้ามสามารถทำให้สารสื่อสารลดลงด้วยเหตุการณ์ Long Term Depression (LTD) (Hirano, 2013)

Neurotrophin signaling pathway โดย neurotrophins เป็นตระกูลของโปรตีนที่หลั่งออกมาในระบบประสาทส่วนปลาย (the peripheral nervous system) และระบบประสาทส่วนกลาง (the central nervous system) ที่สนับสนุนการอยู่รอดของเซลล์ประสาท (neuronal survival) การยืดหยุ่นของการสื่อสารระหว่างเซลล์ (synaptic plasticity) และการสร้างเซลล์ประสาท (neurogenesis) การเปลี่ยนแปลงของการส่งสัญญาณ brain-derived neurotrophic factor (BDNF) และ TrkB เป็นกลไกที่มีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของกระบวนการรู้คิดในผู้สูงอายุและผู้ที่มีความเสี่ยงเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรู้คิด (Numakawa & Odaka, 2022)

ผลของโมดูลที่สำคัญในเครือข่าย

ในโมดูลที่ 1 มีความเกี่ยวข้องกันกับยีน ACHE, AR, CA1, CA2, HSD11B1 ที่ทำหน้าที่ร่วมกันในกระบวนการ metabolic process (p -value = 0.0125, cluster frequency = 100.0%) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีและวิถีที่ประกอบด้วย แอนาบอลิซึมและแคแทบอลิซึม (anabolism and catabolism) โดยเปลี่ยนสิ่งมีชีวิตเป็นสารเคมี โดยทั่วไปกระบวนการเมแทบอลิซึมจะเปลี่ยนโมเลกุลขนาดเล็ก รวมถึง กระบวนการระดับโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น การซ่อมแซมและการจำลอง DNA และการสังเคราะห์และการย่อยสลายโปรตีน เมื่อคิดตามค่านัยสำคัญที่ต่ำสุดในโมดูล (p -value = 0.0003) พบว่าเกี่ยวข้องกันกับยีน ACHE ในกระบวนการ negative regulation of synaptic transmission, cholinergic ซึ่งเป็นกระบวนการในการสื่อสารจากเซลล์ประสาทหนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งผ่านไซแนปส์โดยใช้สารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน (neurotransmitter acetylcholine)

ในโมดูลที่ 2 มีความเกี่ยวข้องกันกับยีน ADORA2A, DRD2, SLC6A2, KDR, NPC1L1, SIGMAR1, NR1H3, BCHE, MAOB, NR3C1, CHRM2 ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันในกระบวนการ multicellular organismal process (p -value = 0.0048921, cluster frequency = 72.7%) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในระดับของหลายเซลล์ (multicellular organism) เมื่อคิดตามค่านัยสำคัญที่ต่ำสุดในโมดูล (p -value = 0.0000028) พบว่าเกี่ยวข้องกันกับยีน MAOB, ADORA2A, DRD2 ซึ่งอยู่ใน

กระบวนการ regulation of amine transport ซึ่งเป็นกระบวนการที่นำ amines เคลื่อนที่เข้า ออก ภายในเซลล์ และเชื่อมระหว่างเซลล์ ด้วยวิธีการขนส่ง หรือการผ่านเข้ารู เป็นต้น

ในโมดูลที่ 3 มีความเกี่ยวข้องกับยีน AKR1B10, SHBG, ESR1, ESR2, SLC6A4, PTPN1 ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันในกระบวนการ multicellular organismal process (p -value = 0.0119560, cluster frequency = 83.3%) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในระดับของหลายเซลล์ (multicellular organism) เมื่อคิดตามค่านัยสำคัญที่ต่ำสุดในโมดูล (p -value = 0.00000087923) พบว่าเกี่ยวข้องกับยีน ESR1 ESR2 แสดงความเกี่ยวข้องใน 2 กระบวนการ ได้แก่ uterus development และ vagina development ซึ่งเป็นกระบวนการพัฒนาการสืบพันธุ์ตั้งแต่การก่อตัวถึงระยะสมบูรณ์ (formation to the mature structure)

ในโมดูลที่ 7 มีความเกี่ยวข้องกับยีน AKR1C3 ซึ่งทำหน้าที่ในกระบวนการ organic acid metabolic process (p -value = 0.040, cluster frequency = 100.0%) ซึ่งเป็นวิถีและกระบวนการทางเคมีของ organic acids ที่เป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์

ในโมดูลที่ 9 มีความเกี่ยวข้องกับยีน PSEN1 PTPN2 TRPV1 ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกัน พบในหลายกระบวนการ ได้แก่ cell surface receptor linked signaling pathway (p -value = 0.0048921, cluster frequency = 100.0%) ซึ่งเป็นชุดของสัญญาณที่เชื่อมต่อโมเลกุลภายนอกเซลล์โดยการกระตุ้นตัวรับบนพื้นผิวของเซลล์ และสิ้นสุดที่กระบวนการส่งสัญญาณควบคุมกระบวนการของเซลล์ เช่น transcription กระบวนการ response to chemical stimulus (p -value = 0.00107, cluster frequency = 100.0%) เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะหรือกิจกรรมของเซลล์ จากการกระตุ้นทางเคมี และ กระบวนการ Signaling (p -value = 0.01048, cluster frequency = 100.0%) เป็นกระบวนการที่มีการส่งข้อมูลภายใน ระบบทางชีวภาพ โดยเริ่มต้นที่สัญญาณ (active signal) และสิ้นสุดที่การตอบสนองของเซลล์ เมื่อคิดตามค่านัยสำคัญที่ต่ำสุดใน โมดูล (p -value = 0.00021) พบเกี่ยวข้องกับยีน PSEN1 ในกระบวนการ Cajal-Retzius cell differentiation ซึ่งเป็นกระบวนการที่ neuroblast มีคุณสมบัติเฉพาะทางโครงสร้างและคุณสมบัติเป็นเซลล์ Cajal-Retzius cell ในสมองส่วน cerebral cortex

สรุปการอภิปรายผลระยะที่ 1

เมื่อย้อนกลับไปดูปฏิสัมพันธ์กับโครงข่ายทางเภสัชวิทยา พบว่าโปรตีนที่กล่าวมามีปฏิสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับสารกลุ่ม flavonoids และ terpenes รวมไปถึงกลุ่ม amino สารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและลดการอักเสบได้ผ่านหลายกลไก เช่น ยับยั้งความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพิ่มกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระและลดการเกิด lipid

peroxidation ลดสื่อกลางการอักเสบบางส่วน ลดทอนความผิดปกติของ synaptic ป้องกันการทำงานของ acetylcholinesterase และป้องกันการตายของเซลล์ประสาท เป็นต้น (Tsai, Kao, & Cheng, 2022) โดยเข้าจับกับยีนมีความเกี่ยวข้องกับโรค MCI ผ่านหลายกระบวนการภายในของเซลล์ เช่น MAPK1, GRB2 – เป็นยีนที่ควบคุมการทำงานภายในของเซลล์, SRC - เป็นยีนที่อาจทำให้เกิด neuroinflammatory processes และยังมีเกี่ยวข้องกับกลไกอื่นๆ เช่น insulin signaling จากยีน PIK3R1, Estrogen signaling จากยีน ESR1 รวมถึงยังสามารถปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective) และเป็นการเผาผลาญพลังงาน (energy metabolism) ภายในสมอง จากยีน AKT1 นอกจากนี้ ยีน TP53 แสดง biomarker ในการทำนาย กระบวนการเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative processes) และบ่งบอกถึงความผิดปกติของ CNS dysfunction จากยีน FYN ได้อีกด้วย

ระยะที่ 2 การเตรียมสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ และทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม

การตรวจสอบสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ

ผลการตรวจสอบปริมาณของสารสกัด (extraction yield; EY) พบว่า มีปริมาณสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะอยู่ 24.79% และเมื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของตำรับยาด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC) พบสารเรืองแสงสีขาวย สีฟ้า สีแดง สีเขียว และน้ำตาล ซึ่งสามารถระบุได้ว่าเป็นสารกลุ่ม steroids, prostaglandins, carbohydrates, phenols, glycosides, น้ำมันหอมระเหย นอกจากนี้ยังพบแถบสีน้ำตาล สีเทาถึงเทาดำ สามารถระบุว่าเป็นสารกลุ่ม lipids, steroids, lactones, ketoacids, hydroxy acid, unsaturated fatty acid และสารกลุ่ม phenolic ได้ ซึ่งพบได้ทั้งในเครื่องยาบดระเอียด ทั้งก่อน แห้วหุ้ม และพริกไทยดำ (สิริเพ็ญ เลื่อนเชย & สิรินันต์ เตียงกุล, 2551) สอดคล้องกับการศึกษาในระยะที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับยีนที่สัมพันธ์กับวิถีของ MCI

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) พบปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 164.029 ± 5.086 mg of GAE equivalent/ g of extract โดยปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกเป็นปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกจัดอยู่ในกลุ่มที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และส่งผลต่อการเกิด MCI ด้วย โดยที่โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกมีหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่บนโครงสร้างวงแหวน ซึ่งสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระเพื่อสร้างความเสถียรได้ และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (scavenging activity) ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นกลุ่มอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) มีฤทธิ์ในการขจัดอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 9.470 ± 0.846 mg of Trolox equivalent/ g of extract และมีความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 20.757 ± 1.306 mg of Trolox equivalent/ g of extract รวมถึงการศึกษาคูสมบัติของการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อให้อยู่ในสถานะที่เสถียรด้วยวิธี FRAP พบว่า มีความสามารถในการลดอนุมูลอิสระเท่ากับ 2.106 ± 0.019 mg of Trolox equivalent/ g of extract

การศึกษาผลของการต้านอนุมูลอิสระในระยะนี้ถูกคำนวณเปรียบเทียบเป็นค่า mg of Trolox equivalent/ g of extract เนื่องจากมีค่า % Inhibitory ที่น้อย ซึ่งแสดงผลการศึกษาแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ วริรัตน์ โสรส, อรัญญา ไทยกุล, & สุภัตสร วันสุทะ (2557) ที่พบฤทธิ์

ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่สกัดด้วย 40% ethanol สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ถึง 67.35% (วีรัตน์ โสรส et al., 2557) และสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ผ่าน ABTS โดยรวมเท่ากับ 7.73 mg of Vitamin E equivalent/ g of extract (รัตติยา ตั้งบุษกาเกียรติ, 2562)

ผลของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในการปกป้องเซลล์ประสาท

การทดสอบความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) ที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) พบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) ที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่สุดคือสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.625 $\mu\text{g/ml}$ ร้อยละการรอดชีวิต เท่ากับ 83.072 ± 5.939 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ค่อนข้างต่ำ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร AAR อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ยิ่งน้อยลง และเมื่อทดสอบผลของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในการปกป้องเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมด้วย D-galactose ที่ความเข้มข้น 50 mM ไม่พบความแตกต่างของร้อยละการรอดชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสาร D-galactose อย่างเดียว ส่วนการทดสอบ D-galactose ที่ความเข้มข้น 100 mM พบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ที่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับสาร D-galactose อย่างเดียว

แสดงให้เห็นว่าสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมด้วย D-galactose ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งเมื่อเทียบกับผลการทดสอบความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ พบผลไปในทิศทางเดียวกัน อาจจะมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะมีฤทธิ์ในการกำจัดเซลล์มากกว่าการปกป้องเซลล์ หรือสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ผ่านกลไกอื่น ที่ไม่สามารถเหนี่ยวนำผ่านสาร D-galactose ได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2), Scopolamine, $\text{A}\beta$ 1-42 หรือ L-glutamate เป็นต้น (Gallego et al., 2022; Vago, Wallenstein, & Morris, 2014)

สรุปการอภิปรายผลระยะที่ 2

การออกฤทธิ์ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะมีผลในกระบวนการต้านออกซิเดชันผ่านการเหนี่ยวนำด้วย D-galactose ในปริมาณที่ต่ำ เห็นได้จากผลของการต้านออกซิเดชันในหลอดทดลองและผลการปกป้องการเกิดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย D-galactose ในเซลล์ SH-SY5Y แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกอื่นที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม เช่น ขยับยั้งการอักเสบ หรือมีฤทธิ์ต่อโรคในกลุ่ม cancer ซึ่งสามารถฆ่าเซลล์ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย และยังเป็นหนึ่งในโรคที่มีวิธีนัยสำคัญจากการทำนายจากโครงข่ายทางเภสัชวิทยาและจากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดตำรับยา

อายุวัฒนะ อย่างไรก็ตาม การศึกษาฤทธิ์ในการจัดการเซลล์ในกลุ่มมะเร็ง ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม และเปรียบเทียบผลการศึกษาในเซลล์ปกติด้วย



ระยะที่ 3 การศึกษาพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด MCI

การทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ

การทดสอบการเรียนรู้และความจำ (Escape latency) ด้วย Morris water maze (MWM) ในหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะขนาด 500 mg/kg BW และถูกเหนี่ยวนำด้วย D-galactose ขนาด 300 mg/kg BW จากการศึกษาพบว่า ผลการเรียนรู้และความจำแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มในวันที่ 42 ซึ่งกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ (none) ใช้เวลาในการเรียนรู้มากกว่ากลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม (water) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) กลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อม (water) ใช้เวลาในการเรียนรู้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะส่งผลต่อการเรียนรู้และความจำ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ และกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะมีพฤติกรรมเรียนรู้ที่ดีขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 เมื่อเทียบกับวันที่ 1

การทดสอบความจำเรียกคืน (Retention time) ผ่านการทดสอบพฤติกรรมที่หนูว่ายน้ำเข้าไปในโซนที่เคยมีแท่นใต้น้ำ ด้วยเครื่องมือ MWM พบความแตกต่างของกลุ่มในวันที่ 29 และวันที่ 43 โดยในวันที่ 29 กลุ่มควบคุมเชิงบวก คือกลุ่มที่ได้รับ Donepezil ขนาด 3 mg/kg BW สามารถเรียกคืนความจำได้น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ แต่ในวันที่ 43 กลุ่มควบคุมเชิงบวกสามารถเรียกคืนความจำได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ นอกจากนี้กลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ ยังสามารถเรียกคืนความจำได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะเรียกคืนความจำได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวกในสัปดาห์ที่ 3 และแต่น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ สัปดาห์ที่ 4 อย่างไรก็ตาม การยังแสดงผลยังไม่ชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอื่นๆ สอดคล้องกับในการศึกษาของ Chogtu et al (2018) ที่ทำการศึกษการใช้ D-galactose ขนาด 200 mg/kg BW ทางปากและได้ผิวหนังในหนูทดลอง เป็นเวลา 2-8 สัปดาห์ ผลพบว่าการให้สาร D-galactose ส่งผลต่อการเรียนรู้และความจำเมื่อให้ยาแบบเฉียบพลัน ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 แต่กลับไม่ปรากฏผลเมื่อทำการทดลองแบบเรื้อรัง ในสัปดาห์ที่ 8 (Chogtu et al., 2018)

การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ประสาทที่ถูกย้อมด้วย H&E

เมื่อทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ประสาทที่ถูกย้อมด้วย H&E ในสมองแต่ละส่วน พบความแตกต่างเพียงในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ (Cerebral cortex) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการ

เรียนรู้ รวมถึงการทำงานของกล้ามเนื้อ โดยกลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะพบจำนวนเซลล์ที่ติดสีเข้มและฝ่อลีบน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวก และพบการติดสีมากกว่ากลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำ เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก แสดงว่า สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะสามารถปกป้องการฝ่อลีบของเซลล์สมองได้ดีกว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก

ในสมองส่วนซีรีเบลลัม (Cerebellum) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการทรงตัวและการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อต่างๆ และ ฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) ทำหน้าที่หลักเกี่ยวกับความจำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความจำระยะยาว รวมถึงความจำด้านทิศทาง ทั้งสองส่วนนี้ไม่พบความแตกต่างของจำนวนเซลล์ประสาทที่ถูกย้อมด้วย H&E

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบวิธีการย้อมด้วย H&E เป็นวิธีการศึกษารูปร่าง ลักษณะ และส่วนประกอบโดยทั่วไปของเซลล์ ซึ่งการยืนยันการตายของเซลล์ประสาท ที่มี Nissl substances ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง จึงควรย้อมสี cresyl violet ที่มีคุณสมบัติเป็นกรดเพิ่มเติม เพื่อบ่งบอกการตายของเซลล์ประสาท และผลควรเป็นไปในแนวทางเดียวกัน (Zille et al., 2012)

การวิเคราะห์ปริมาณ Biomarkers ในสมองหนูทดลอง

ปริมาณของ Malondialdehyde (MDA) เป็น biomarker ที่บ่งชี้ถึงกระบวนการ Lipid peroxidation ซึ่งเป็นกระบวนการที่อนุมูลอิสระเข้าไปทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยปริมาณของ MDA ที่มาก จะส่งผลต่อเซลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์จากการเกิดอนุมูลอิสระ ผลการศึกษานี้พบว่าในเนื้อสมองของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะมีปริมาณ MDA ที่ถูกผลิตขึ้นในสมองน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารใดๆ เหมือนกับกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำและกลุ่มควบคุมเชิงบวก และยังมีปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมอีกด้วย

นอกจากนั้นการทำงานของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) เป็นอีกหนึ่งสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่บ่งชี้ถึงกระบวนการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาที่ทำลายสารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (O_2) ทำให้ไม่เกิดการออกซิเดชันและทำลายเซลล์ ในการศึกษาไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มใดๆ แสดงว่าสารสกัดของตำรับยาอายุวัฒนะไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ SOD โดย SOD เป็นเอนไซม์ที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงต่อปัจจัยทั้งภายนอกและภายในร่างกายที่สูง เช่น ความเครียด การพักผ่อน สภาพแวดล้อมต่างๆ เป็นต้น

สรุปผลการอภิปรายระยะที่ 3

สารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะ (AAR) ส่งผลต่อการเรียนรู้และความจำในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และแสดงผลให้เห็นในสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป เมื่อเทียบกับก่อนรับประทาน แต่ผลด้านการเรียกคืนความจำยังไม่ชัดเจนเท่าที่ควร โดยเครื่องมือ Morris water maze (MWM) เป็นวิธีการทดสอบที่บ่งชี้ถึงความจำด้านทิศทางและสถานที่ (spatial memory) ได้เฉพาะเจาะจงมากที่สุด กลไกการทำงานของสาร AAR สามารถยืนยันผลได้จากปริมาณ MDA ที่เกิดขึ้นในสมอง ซึ่งเป็นกลไกที่ลดการผลิตสารอนุมูลอิสระ แตกต่างจากผลของการศึกษาในหลอดทดลองที่แสดงถึงความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระในปริมาณที่ต่ำ และในผลของการปกป้องเซลล์ประสาท ก็แตกต่างจากผลในการส่องเซลล์ประสาทที่ย้อมด้วย H&E ที่พบจำนวนการย้อมติดสีของเซลล์ในกลุ่มสาร AAR ในปริมาณที่น้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ เป็นไปได้ว่ากลไกที่สาร AAR ออกฤทธิ์ไม่ใช่กลไกที่จับตัวสารอนุมูลอิสระ แต่การเกิดจากกลไกอื่น เช่น ลดการทำงานของการสร้างสารอนุมูลอิสระ หรือเป็นกลไกที่เกี่ยวกับการเกิด MCI จากการทำนายทางคอมพิวเตอร์ในระยะที่ 1 เช่น วิถี PI3K-AKT, MAPK, PPARs เป็นต้น ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ Apoptosis

ข้อเสนอแนะในการศึกษา

1. การศึกษาทางคอมพิวเตอร์ ควรการศึกษาการเข้ากันได้ในระดับโมเลกุล (molecular docking) เพื่อยืนยันผลความเข้ากันของระหว่างสารประกอบและยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับ MCI
2. การศึกษาประสิทธิภาพในระดับยีน จากผลของโครงข่ายทางเภสัชวิทยา (network pharmacology) ในห้องปฏิบัติการ เป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพื่อใช้ยืนยันผลโดยรวมของตำรับยาอายุวัฒนะ
3. การศึกษาในระดับเซลล์ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์อื่นที่เกี่ยวข้องกับวิธีที่มีนัยสำคัญ จากโครงข่ายทางเภสัชวิทยา เช่น เซลล์มะเร็ง เซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นต้น
4. การศึกษาในสัตว์ทดลองควรมีการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะรวมถึงกลุ่มที่ป้อนด้วยสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะเพียงอย่างเดียว และการตรวจสอบ biomarkers ด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม
5. การศึกษาการตายของเซลล์ประสาทในสมองหนูทดลองแบบเฉพาะเจาะจง ควรทำการย้อมสีด้วย cresyl violet เพิ่มเติม

ภาคผนวก

ใบแจ้งผลการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้

ที่ สธ ๐๕๑๕.๐๓/ ๕๙๓๑



กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก
กระทรวงสาธารณสุข
ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี ๑๑๐๐๐

๓/

พฤศจิกายน ๒๕๖๔

เรื่อง แจ้งผลการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย

เรียน คณบดีวิทยาลัยวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา มหาวิทยาลัยบูรพา

อ้างถึง หนังสือมหาวิทยาลัยบูรพา ที่ ฮว ๘๑๒๔/๐๑๖๔ ลงวันที่ ๒๘ ตุลาคม ๒๕๖๔

สิ่งที่ส่งมาด้วย ใบแจ้งผลการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย จำนวน ๑ ฉบับ

ตามที่อ้างถึง วิทยาลัยวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา มหาวิทยาลัยบูรพา ได้ขอความอนุเคราะห์จัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัยสมุนไพร การศึกษาวิจัยดัชนีพิษ เรื่องฤทธิ์ของสารสกัดตำรับยาอายุวัฒนะในการป้องกันความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI) ในหนูโมสที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาทด้วย D-galactose โดยมีนางสาวสุฐิตา โอภาชี เป็นผู้วิจัย ภายใต้การควบคุมดูแลของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรัชญา แก้วแก่น นั้น

ในกรณี กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก โดยสำนักงานวิจัยการแพทย์แผนไทย ได้ดำเนินการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย และออกเลข voucher specimens ดังกล่าวแล้ว จึงขอแจ้งผลจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย เพื่อใช้ในการอ้างอิงงานวิจัยต่อไป รายละเอียดตามสิ่งที่ส่งมาด้วย

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(นายอติ แสวงธรรม)

รองอธิบดี ปฏิบัติราชการแทนอธิบดี
กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

สำนักงานวิจัยการแพทย์แผนไทย

โทร. ๐ ๒๒๒๔ ๓๒๖๕

โทรสาร ๐ ๒๒๒๔ ๓๒๖๕



ใบแจ้งผลการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย (voucher specimens)

ที่ อว.๘๑๒๔/๑๓๖๔ ลงวันที่ ๒๘ ตุลาคม ๒๕๖๔... กำหนดรับผลการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย
วันที่ ๑๒ พฤศจิกายน ๒๕๖๔ ผู้รับมอบหมาย นางสาวลลิตา ศรีมงคลนิมิตร วันที่ ๑๓ พฤศจิกายน ๒๕๖๔....

หมายเหตุ: () ส่งตัวอย่างคืนผู้ยื่นคำขอ จัดเก็บตัวอย่างเข้าพิพิธภัณฑ์พืช () ไม่เก็บ

จัดทำตัวอย่างอ้างอิงงานวิจัย (voucher specimens)

ผลการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัยและหมายเลขอ้างอิง

ตามที่พิพิธภัณฑ์พืช กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก (Thai Traditional Medicine Herbarium: TTM Herbarium) ได้จัดทำตัวอย่างเครื่องยาอ้างอิง (authentic crude drugs) จำนวน ๖ หมายเลข ประกอบด้วยพืชสมุนไพรที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ดังนี้

๑. *Albizia procera* (Roxb.) Benth. มีชื่อไทยว่า ทิงถ่อน (Ting thon) รหัสอ้างอิงประจำพิพิธภัณฑ์พืช คือ S. Obhasi ๖๑๘๑๐๑ (TTM-c No. ๑๐๐๐๖๑๔)
๒. *Diospyros rhodocalyx* Kurz มีชื่อไทยว่า ตะโกนา (Tako na) รหัสอ้างอิงประจำพิพิธภัณฑ์พืช คือ S. Obhasi ๖๑๘๑๐๒ (TTM-c No. ๑๐๐๐๖๑๕)
๓. *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson มีชื่อไทยว่า บอระเพ็ด (Bora phet) รหัสอ้างอิงประจำพิพิธภัณฑ์พืช คือ S. Obhasi ๖๑๘๑๐๓ (TTM-c No. ๑๐๐๐๖๑๖)
๔. *Cyperus rotundus* L. มีชื่อไทยว่า หญ้าแห้วหมู (Ya hao mu) รหัสอ้างอิงประจำพิพิธภัณฑ์พืช คือ S. Obhasi ๖๑๘๑๐๔ (TTM-c No. ๑๐๐๐๖๑๗)
๕. *Streblus asper* Lour. มีชื่อไทยว่า ข่อย (Khoi) รหัสอ้างอิงประจำพิพิธภัณฑ์พืช คือ S. Obhasi ๖๑๘๑๐๕ (TTM-c No. ๑๐๐๐๖๑๘)
๖. *Piper nigrum* L. มีชื่อไทยว่า พริกไทย (Phrik thai) รหัสอ้างอิงประจำพิพิธภัณฑ์พืช คือ S. Obhasi ๖๑๘๑๐๖ (TTM-c No. ๑๐๐๐๖๑๙)

ลลิตา ศรีมงคลนิมิตร
(นางสาวลลิตา ศรีมงคลนิมิตร)
นักวิชาการสาธารณสุขปฏิบัติการ

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์



ที่ 011/2566

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์

คณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้พิจารณาโครงการ

รหัสโครงการ IACUC 011/2566

ชื่อข้อเสนอการวิจัย

ภาษาไทย ฤทธิ์ของสารสกัดตำรับอายุวัฒนะในการป้องกันความผิดปกติเล็กน้อยของความสามารถสมอง (MCI) ในหนูโมเสซินิต ICN ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาทด้วย D-galactose

หัวหน้าโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรัชญา แก้วแก่น

หน่วยงานที่สังกัด: วิทยาลัยวิทยาการวิจัย
และวิทยาการปัญญา

ผู้ร่วมโครงการวิจัย คนที่ 1: ดร.สันติ โทธิ์ศรี

หน่วยงานที่สังกัด: คณะวิศวกรรมศาสตร์

ผู้ร่วมโครงการวิจัย คนที่ 2: ดร.อุทัยพร โภแก้ว

หน่วยงานที่สังกัด: วิทยาลัยวิทยาการวิจัย
และวิทยาการปัญญา

ผู้ร่วมโครงการวิจัย คนที่ 3: นางสาวสุธิดา โอภาซี

หน่วยงานที่สังกัด: นิติระดับบัณฑิตศึกษา
วิทยาลัยวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา

โครงการนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา แล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับข้อกำหนดการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ คณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ ตามโครงการนี้ได้

วันที่รับรอง : วันที่ 30 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2566

วันที่หมดอายุ : วันที่ 30 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2567

ลงนาม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรัชญา แก้วแก่น)

ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

บรรณานุกรม

- Abood, W. N., Fahmi, I., Abdulla, M. A., & Ismail, S. (2014). Immunomodulatory effect of an isolated fraction from *Tinospora crispa* on intracellular expression of INF- γ , IL-6 and IL-8. *BMC complementary and alternative medicine*, *14*(1), 205.
- Ahmad, W., Jantan, I., & Bukhari, S. N. A. (2016). *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson: A Review of Its Ethnobotanical, Phytochemical, and Pharmacological Aspects. *Frontiers in pharmacology*, *7*(59). doi:10.3389/fphar.2016.00059
- Ahmad, W., Jantan, I., Kumolosasi, E., & Bukhari, S. N. (2015). Immunostimulatory effects of the standardized extract of *Tinospora crispa* on innate immune responses in Wistar Kyoto rats. *Drug Des Devel Ther*, *9*, 2961-2973. doi:10.2147/dddt.S85405
- Alkethiri, K., Almtroudi, T., Jurays, A. b., Abanumay, F., Aldammas, M., AlKhodheer, M., . . . Bashir, S. (2021). The relationship between type 2 diabetes mellitus with cognitive functions. *Heliyon*, *7*(3), e06358. doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06358>
- Amor-Gutiérrez, O., Costa-Rama, E., Arce-Varas, N., Martínez-Rodríguez, C., Novelli, A., Fernández-Sánchez, M. T., & Costa-García, A. (2020). Competitive electrochemical immunosensor for the detection of unfolded p53 protein in blood as biomarker for Alzheimer's disease. *Anal Chim Acta*, *1093*, 28-34. doi:10.1016/j.aca.2019.09.042
- Anderson, N. D. (2019). State of the science on mild cognitive impairment (MCI). *CNS Spectr*, *24*(1), 78-87. doi:10.1017/s1092852918001347
- Bader, G. D., & Hogue, C. W. V. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC bioinformatics*, *4*(1), 2. doi:10.1186/1471-2105-4-2
- Baierle, M., Nascimento, S. N., Moro, A. M., Brucker, N., Freitas, F., Gauer, B., . . . Trentini, C. M. (2015). Relationship between inflammation and oxidative stress and cognitive decline in the institutionalized elderly. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2015*.
- Bassett, D. S., & Sporns, O. (2017). Network neuroscience. *Nat Neurosci*, *20*(3), 353-364. doi:10.1038/nn.4502
- Bukhari, I., Alhumayyd, M., Mahesar, A., & Gilani, A. (2013). The analgesic and anticonvulsant effects of piperine in mice. *Journal of physiology and pharmacology*, *64*(6), 789.

- Cavin, A., Hostettmann, K., Dyatmyko, W., & Potterat, O. (1998). Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Med*, *64*(05), 393-396.
- Cenini, G., Sultana, R., Memo, M., & Butterfield, D. A. (2008). Elevated levels of pro-apoptotic p53 and its oxidative modification by the lipid peroxidation product, HNE, in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, *12*(3), 987-994. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00163.x
- Chaiwiang, N., Pongpattanawut, S., Khorana, N., Thanoi, S., & Teaktong, T. (2016). Role of Piperine in Cognitive Behavior and the Level of Nicotinic Receptors (nAChRs) in Mouse Brain. *Thai Journal of Pharmacology*, *38*(2), 5-16.
- Chandran, U., Mehendale, N., Tillu, G., & Patwardhan, B. (2015). Network Pharmacology: An Emerging Technique for Natural Product Drug Discovery and Scientific Research on *Ayurveda*. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, *81*, 8. doi:10.16943/ptinsa/2015/v81i3/48229
- Chen, X., Ma, L., Zhao, J., Pan, X., & Chen, S. (2023). Association between cognitive impairment promoted by high-fat diet and increase in PTEN phosphorylation. *Behav Brain Res*, *447*, 114421. doi:10.1016/j.bbr.2023.114421
- Cheng, Y.-W., Chen, T.-F., & Chiu, M.-J. (2017). From mild cognitive impairment to subjective cognitive decline: conceptual and methodological evolution. *Neuropsychiatric disease and treatment*, *13*, 491-498. doi:10.2147/NDT.S123428
- Chithran, A., Ramesh Babu, T., & Himaja, N. (2012). Comparative study on anti-inflammatory activity of *Cyperus rotundus* (L.) using different solvent system in carragenan induced paw edema in albino wistar rats. *Int J Phytopharmacol*, *3*, 130-134.
- Chogtu, B., Arivazhahan, A., Kunder, S. K., Tilak, A., Sori, R., & Tripathy, A. (2018). Evaluation of Acute and Chronic Effects of D-Galactose on Memory and Learning in Wistar Rats. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, *16*(2), 153-160. doi:10.9758/cpn.2018.16.2.153
- Choi, J. S., Kim, H. Y., Chung, J. W., Chun, M. H., Kim, S. Y., Yoon, S. H., & Lee, M. Y. (2005). Activation of Src tyrosine kinase in microglia in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*, *380*(1-2), 1-5. doi:10.1016/j.neulet.2005.01.015
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2019). SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res*, *47*(W1),

W357-W364. doi:10.1093/nar/gkz382

- Daroi, P. A., Dhage, S. N., & Juvekar, A. R. (2022). p-Coumaric acid protects against D-galactose induced neurotoxicity by attenuating neuroinflammation and apoptosis in mice brain. *Metab Brain Dis*, 37(7), 2569-2579. doi:10.1007/s11011-022-01007-3
- Dechakhamphu, A. (2560). พฤษเคมีที่เป็นยาอายุวัฒนะ: บทเรียนจากการ ศึกษาใน *Caenorhabditis elegans*. วารสารหมอยาไทยวิจัย, 3(1), 1-8.
- Deng, Y., Zhang, J., Sun, X., Ma, G., Luo, G., Miao, Z., & Song, L. (2020). miR-132 improves the cognitive function of rats with Alzheimer's disease by inhibiting the MAPK1 signal pathway. *Exp Ther Med*, 20(6), 159. doi:10.3892/etm.2020.9288
- Dosoky, N. S., Satyal, P., Barata, L. M., da Silva, J. K. R., Setzer, W. N., & Mancianti, F. (2019). Volatiles of Black Pepper Fruits (*Piper nigrum* L.). *Molecules*, 24(23), 4244. doi:10.3390/molecules24234244
- Drachman, D. A. (2006). Aging of the brain, entropy, and Alzheimer disease. *Neurology*, 67(8), 1340-1352. doi:10.1212/01.wnl.0000240127.89601.83
- Elcoroaristizabal Martín, X., Fernández Martínez, M., Galdos Alcelay, L., Molano Salazar, A., Bereincua Gandarias, R., Inglés Borda, S., . . . de Pancorbo, M. M. (2011). Progression from amnesic mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: ESR1 and ESR2 polymorphisms and APOE gene. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 32(5), 332-341. doi:10.1159/000335541
- Eshkooor, S. A., Hamid, T. A., Mun, C. Y., & Ng, C. K. (2015). Mild cognitive impairment and its management in older people. *Clinical interventions in aging*, 10, 687-693. doi:10.2147/cia.S73922
- Fan, C., Wang, J. X., Xiong, Z. E., Hu, S. S., Zhou, A. J., Yuan, D., . . . Wang, T. (2023). Saponins from *Panax japonicus* improve neuronal mitochondrial injury of aging rats. *Pharm Biol*, 61(1), 1401-1412. doi:10.1080/13880209.2023.2244532
- Gallego, R., Valdés, A., Sánchez-Martínez, J. D., Suárez-Montenegro, Z. J., Ibáñez, E., Cifuentes, A., & Herrero, M. (2022). Study of the potential neuroprotective effect of *Dunaliella salina* extract in SH-SY5Y cell model. *Anal Bioanal Chem*, 414(18), 5357-5371. doi:10.1007/s00216-021-03819-1
- Gfeller, D., Grosdidier, A., Wirth, M., Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2014).

- SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res*, 42(Web Server issue), W32-38. doi:10.1093/nar/gku293
- Guglietti, B., Sivasankar, S., Mustafa, S., Corrigan, F., & Collins-Praino, L. E. (2021). Fyn Kinase Activity and Its Role in Neurodegenerative Disease Pathology: a Potential Universal Target? *Mol Neurobiol*, 58(11), 5986-6005. doi:10.1007/s12035-021-02518-3
- Han, J., El Omri, A., Sasaki, K., & Isoda, H. (2015). Chapter 81 - Caffeoylquinic Acid Protects against Alzheimer's Disease through Inhibition of Amyloid Beta-Induced Toxicity. In V. R. Preedy (Ed.), *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 729-735). San Diego: Academic Press.
- Hayes, G., Pinto, J., Sparks, S. N., Wang, C., Suri, S., & Bulte, D. P. (2022). Vascular smooth muscle cell dysfunction in neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 16. doi:10.3389/fnins.2022.1010164
- Heidari, S., Mehri, S., Shariaty, V., & Hosseinzadeh, H. (2018). Preventive effects of crocin on neuronal damages induced by D-galactose through AGEs and oxidative stress in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y). *J Pharmacopuncture*, 21(1), 18-25. doi:10.3831/kpi.2018.21.003
- Hemanth Kumar, K., Tamatam, A., Pal, A., & Khanum, F. (2013). Neuroprotective effects of *Cyperus rotundus* on SIN-1 induced nitric oxide generation and protein nitration: Ameliorative effect against apoptosis mediated neuronal cell damage. *NeuroToxicology*, 34, 150-159. doi:10.1016/j.neuro.2012.11.002
- Herholz, K. (2008). Acetylcholine esterase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 35(1), 25-29. doi:10.1007/s00259-007-0699-4
- Hernandez-Ruiz, V., Letenneur, L., Fülöp, T., Helmer, C., Roubaud-Baudron, C., Avila-Funes, J. A., & Amieva, H. (2022). Infectious diseases and cognition: do we have to worry? *Neurol Sci*, 43(11), 6215-6224. doi:10.1007/s10072-022-06280-9
- Hirano, T. (2013). Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 89(5), 183-195. doi:10.2183/pjab.89.183
- Huang, J., Cheung, F., Tan, H. Y., Hong, M., Wang, N., Yang, J., . . . Zheng, Q. (2017). Identification of the active compounds and significant pathways of yinchenhao decoction

- based on network pharmacology. *Mol Med Rep*, 16(4), 4583-4592. doi:10.3892/mmr.2017.7149
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J Ethnopharmacol*, 89(2/3), 261. doi:10.1016/j.jep.2003.08.008
- Ingkaninun, K., Panriansaen, R., & Cherdshewasart, W. (2010). Inhibitory effect of the Thai rejuvenating medicinal plant in acetylcholinesterase activity. *Planta Med*, 76(12), P135.
- Jahan, N., & ALI, S. (2012). Cardioprotective and antilipidemic potential of *Cyperus rotundus* in chemically induced cardiotoxicity. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(6).
- Kamala, A., Middha, S. K., & Karigar, C. S. (2018). Plants in traditional medicine with special reference to *Cyperus rotundus* L.: a review. *3 Biotech*, 8(7), 309.
- Ke, Z., Zhang, X., Cao, Z., Ding, Y., Li, N., Cao, L., . . . Xiao, W. (2016). Drug discovery of neurodegenerative disease through network pharmacology approach in herbs. *Biomed Pharmacother*, 78, 272-279. doi:10.1016/j.biopha.2016.01.021
- Kim, Y., & Kim, Y. (2020). L-histidine and L-carnosine exert anti-brain aging effects in D-galactose-induced aged neuronal cells. *Nutr Res Pract*, 14(3), 188-202. doi:10.4162/nrp.2020.14.3.188
- Koay, Y. C., & Koay, F. (2013). A review of the secondary metabolites and biological activities of *Tinospora crispa* (Menispermaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4), 641-649.
- Kountouras, J., Tsolaki, M., Boziki, M., Gavalas, E., Zavos, C., Stergiopoulos, C., . . . Venizelos, I. (2007). Association between *Helicobacter pylori* infection and mild cognitive impairment. *Eur J Neurol*, 14(9), 976-982. doi:10.1111/j.1468-1331.2007.01827.x
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*, 1078, 9-21. doi:10.1007/978-1-62703-640-5_2
- Kraithep, S., Oungbho, K., & Tewtrakul, S. (2008). Anti-allergic activity of Thai medicinal plants used in longevity formulation. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 30(5).
- Kumar, A., Prakash, A., & Dogra, S. (2011). Protective effect of curcumin (*Curcuma longa*) against D-galactose-induced senescence in mice. *J Asian Nat Prod Res*, 13(1), 42-55. doi:10.1080/10286020.2010.544253

- Kumar, K. H., & Khanum, F. (2013). Hydroalcoholic extract of *Cyperus rotundus* ameliorates H₂O₂-induced human neuronal cell damage via its anti-oxidative and anti-apoptotic machinery. *Cellular and molecular neurobiology*, 33(1), 5-17.
- Kumar, R. S., Kar, B., Dolai, N., Karmakar, I., Bhattacharya, S., & Haldar, P. K. (2015). Antitumor activity and antioxidant status of *Streblus asper* bark against Dalton's ascitic lymphoma in mice. *Interdisciplinary Toxicology*, 8(3), 125-130.
- Lee, J., Kim, Y. S., Kim, E., Kim, Y., & Kim, Y. (2020). Curcumin and hesperetin attenuate D-galactose-induced brain senescence in vitro and in vivo. *Nutr Res Pract*, 14(5), 438-452. doi:10.4162/nrp.2020.14.5.438
- Li, H., Zheng, L., Chen, C., Liu, X., & Zhang, W. (2019). Brain Senescence Caused by Elevated Levels of Reactive Metabolite Methylglyoxal on D-Galactose-Induced Aging Mice. *Front Neurosci*, 13, 1004. doi:10.3389/fnins.2019.01004
- Li, T., Zhang, W., Hu, E., Sun, Z., Li, P., Yu, Z., . . . Wang, Y. (2021). Integrated metabolomics and network pharmacology to reveal the mechanisms of hydroxysafflor yellow A against acute traumatic brain injury. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1002-1013. doi:<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.033>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46(1-3), 3-26. doi:10.1016/s0169-409x(00)00129-0
- Liu, T., Yang, K., Li, G., Zhou, K., Tan, J., Chen, J., . . . Ning, W. (2019). Experimental evidence and network pharmacology identify the molecular targets of Tong Sheng tablets in cerebral ischemia reperfusion injury. *American journal of translational research*, 11(6), 3301-3316.
- Lo, R. Y. (2017). The borderland between normal aging and dementia. *Ci ji yi xue za zhi = Tzu-chi medical journal*, 29(2), 65-71. doi:10.4103/tcmj.tcmj_18_17
- Maere, S., Heymans, K., & Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, 21(16), 3448-3449. doi:10.1093/bioinformatics/bti551
- Mahaman, Y. A. R., Huang, F., Embaye, K. S., Wang, X., & Zhu, F. (2021). The Implication of STEP in Synaptic Plasticity and Cognitive Impairments in Alzheimer's Disease and Other

- Neurological Disorders. *Front Cell Dev Biol*, 9, 680118. doi:10.3389/fcell.2021.680118
- Majumder, P., Roy, K., Singh, B. K., Jana, N. R., & Mukhopadhyay, D. (2017). Cellular levels of Grb2 and cytoskeleton stability are correlated in a neurodegenerative scenario. *Dis Model Mech*, 10(5), 655-669. doi:10.1242/dmm.027748
- Mallavadhani, U., Panda, A. K., & Rao, Y. (1998). Review article number 134 pharmacology and chemotaxonomy of diospyros. *Phytochemistry*, 49(4), 901-951.
- Meena, A., Yadav, A., Niranjana, U., Singh, B., Nagariya, A., & Verma, M. (2010). Review on *Cyperus rotundus*-A potential herb. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2(1), 20-22.
- Mehla, J., Singh, I., Diwan, D., Nelson, J. W., Lawrence, M., Lee, E., . . . Zipfel, G. J. (2021). STAT3 inhibitor mitigates cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid plaques while improving cognitive functions and brain networks. *Acta Neuropathol Commun*, 9(1), 193. doi:10.1186/s40478-021-01293-5
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods Mol Biol*, 443, 365-382. doi:10.1007/978-1-59745-177-2_19
- Muhammad, J., Khan, A., Ali, A., Fang, L., Yanjing, W., Xu, Q., & Wei, D. Q. (2018). Network Pharmacology: Exploring the Resources and Methodologies. *Curr Top Med Chem*, 18(12), 949-964. doi:10.2174/1568026618666180330141351
- Ngamrojanavanich, N., Manakit, S., Pornpakakul, S., & Petsom, A. (2006). Inhibitory effects of selected Thai medicinal plants on Na⁺, K⁺-ATPase. *Fitoterapia*, 77(6), 481-483.
- Noor, F., Tahir ul Qamar, M., Ashfaq, U. A., Albutti, A., Alwashmi, A. S. S., & Aljasir, M. A. (2022). Network Pharmacology Approach for Medicinal Plants: Review and Assessment. *Pharmaceuticals*, 15(5), 572.
- Numakawa, T., & Odaka, H. (2022). The Role of Neurotrophin Signaling in Age-Related Cognitive Decline and Cognitive Diseases. *International journal of molecular sciences*, 23(14). doi:10.3390/ijms23147726
- Pal, D., & Dutta, S. (2006). Evaluation of the Antioxidant activity of the roots and Rhizomes of *Cyperus rotundus* L. *Indian journal of Pharmaceutical sciences*, 68(2).
- Pal, R., Tiwari, P. C., Nath, R., & Pant, K. K. (2016). Role of neuroinflammation and latent transcription factors in pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurol Res*, 38(12), 1111-1122.

doi:10.1080/01616412.2016.1249997

- Parameshwaran, K., Irwin, M. H., Steliou, K., & Pinkert, C. A. (2010). D-galactose effectiveness in modeling aging and therapeutic antioxidant treatment in mice. *Rejuvenation research*, 13(6), 729-735. doi:10.1089/rej.2010.1020
- Parooindran, V. (2012). *Antioxidant Activity of Different Fractions from Tinospora Crispa Stems Extracts*. UMP,
- Pepeu, G. (2004). Mild cognitive impairment: animal models. *Dialogues Clin Neurosci*, 6(4), 369-377.
- Petersen, R. C., Lopez, O., Armstrong, M. J., Getchius, T. S. D., Ganguli, M., Gloss, D., . . . Rae-Grant, A. (2018). Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 90(3), 126-135. doi:10.1212/WNL.0000000000004826
- Petersen, R. C., & Negash, S. (2008). Mild cognitive impairment: an overview. *CNS spectrums*, 13(1), 45-53.
- Pillai, J. A., Maxwell, S., Bena, J., Bekris, L. M., Rao, S. M., Chance, M., . . . Initiative, A. s. D. N. (2019). Key inflammatory pathway activations in the MCI stage of Alzheimer's disease. *Annals of clinical and translational neurology*, 6(7), 1248-1262.
- Piñero, J., Ramírez-Angueta, J. M., Saüch-Pitarch, J., Ronzano, F., Centeno, E., Sanz, F., & Furlong, L. I. (2019). The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. *Nucleic Acids Res*, 48(D1), D845-D855. doi:10.1093/nar/gkz1021
- Poonsawat, T., Baydoun, A., Chomko, S., & Talubmook, C. Cytotoxicity and Bioactivities of Extract from Tinospora Crispa Stems ความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดลำต้นบอระเพ็ด.
- Qi, Y., Cheng, X., Jing, H., Yan, T., Xiao, F., Wu, B., . . . Jia, Y. (2019). Combination of schisandrin and nootkatone exerts neuroprotective effect in Alzheimer's disease mice model. *Metab Brain Dis*, 34(6), 1689-1703. doi:10.1007/s11011-019-00475-4
- Rakwarinn Wannasin, Jintana Sattayasai, Prapawadee puapairoj, & Tarinee Arkaravichien. (2010). *Effects of Streblus Asper Leaves Extract on Scopolamine-induced Learning Deficits in Male Rats*. Paper presented at the Srinagarind Med J.

- Rao, D. B., Little, P. B., & Sills, R. C. (2014). Subsite awareness in neuropathology evaluation of National Toxicology Program (NTP) studies: a review of select neuroanatomical structures with their functional significance in rodents. *Toxicol Pathol*, *42*(3), 487-509. doi:10.1177/0192623313501893
- Rastogi, S., Kulshreshtha, D. K., & Rawat, A. K. S. (2006). *Streblus asper* Lour.(Shakhotaka): a review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *3*(2), 217-222.
- Raychaudhuri, M., & Mukhopadhyay, D. (2010). Grb2-mediated alteration in the trafficking of AbetaPP: insights from Grb2-AICD interaction. *J Alzheimers Dis*, *20*(1), 275-292. doi:10.3233/jad-2010-1371
- Reas, E. T., Hagler Jr, D. J., White, N. S., Kuperman, J. M., Bartsch, H., Wierenga, C. E., . . . McEvoy, L. K. (2018). Microstructural brain changes track cognitive decline in mild cognitive impairment. *NeuroImage: Clinical*, *20*, 883-891.
- Salech, F., Ponce, D. P., SanMartín, C. D., Rogers, N. K., Chacón, C., Henríquez, M., & Behrens, M. I. (2017). PARP-1 and p53 Regulate the Increased Susceptibility to Oxidative Death of Lymphocytes from MCI and AD Patients. *Front Aging Neurosci*, *9*, 310. doi:10.3389/fnagi.2017.00310
- Sangeetha, M., Chamundeeswari, D., Saravana Babu, C., Rose, C., & Gopal, V. (2020). Attenuation of oxidative stress in arthritic rats by ethanolic extract of *Albizia procera* benth bark through modulation of the expression of inflammatory cytokines. *J Ethnopharmacol*, *250*, N.PAG-N.PAG. doi:10.1016/j.jep.2019.112435
- Seo, E. J., Lee, D.-U., Kwak, J. H., Lee, S.-M., Kim, Y. S., & Jung, Y.-S. (2011). Antiplatelet effects of *Cyperus rotundus* and its component (+)-nootkatone. *J Ethnopharmacol*, *135*(1), 48-54.
- Shang, J., Yamashita, T., Fukui, Y., Song, D., Li, X., Zhai, Y., . . . Abe, K. (2018). Different Associations of Plasma Biomarkers in Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, Vascular Dementia, and Ischemic Stroke. *J Clin Neurol*, *14*(1), 29-34. doi:10.3988/jcn.2018.14.1.29
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., . . . Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction

- networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504. doi:10.1101/gr.1239303
- Shwe, T., Prachayasakul, W., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2018). Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. *Exp Gerontol*, 101, 13-36. doi:10.1016/j.exger.2017.10.029
- Singsai, K., Akaravichien, T., Kukongviriyapan, V., & Sattayasai, J. (2015). Protective effects of *Streblus asper* leaf extract on H₂O₂-induced ROS in SK-N-SH cells and MPTP-induced Parkinson's disease-like symptoms in C57BL/6 mouse. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Sivakrishnan, S., & Kavitha, J. (2018). AN OVERVIEW ON BENEFITS OF ALBIZIA PROCERA. *IJRAR-International Journal of Research and Analytical Reviews (IJRAR)*, 5(1), 224-230.
- Sivakrishnan, S., Kavitha, J., & Muthu, A. K. (2013). Antioxidant potential, Total Phenolic and Flavonoids content of aerial parts of ethanolic extract of *Albizia procera* (FAMILY: MIMOSOIDEAE). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(1), 108-110.
- Sivakrishnan, S., & Kottaimuthu, A. (2013). In vivo Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of Aerial parts of *Albizia procera* roxb (benth.) against Paracetamol induced Liver Toxicity on Wistar Rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(9), 174.
- Sivakrishnan, S., & Muthu, A. K. (2013). In-vitro free radical scavenging activity of aerial parts of ethanolic extract of *Albizia procera* (Family: Mimosoideae). *Int J Pharm Pharm Sci*, 5(2), 352-354.
- Snowden, S. G., Ebshiana, A. A., Hye, A., An, Y., Pletnikova, O., O'Brien, R., . . . Thambisetty, M. (2017). Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLoS Med*, 14(3), e1002266. doi:10.1371/journal.pmed.1002266
- Song, F., Poljak, A., Smythe, G. A., & Sachdev, P. (2009). Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev*, 61(2), 69-80. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.05.003
- Sorokina, M., & Steinbeck, C. (2020). Review on natural products databases: where to find data in 2020. *Journal of Cheminformatics*, 12(1), 20. doi:10.1186/s13321-020-00424-9
- Sripanidkulchai, B., Junlatat, J., Wara-aswapati, N., & Hormdee, D. (2009). Anti-inflammatory effect of *Streblus asper* leaf extract in rats and its modulation on inflammation-associated

- genes expression in RAW 264.7 macrophage cells. *J Ethnopharmacol*, 124(3), 566-570.
- Stanga, S., Lanni, C., Sinforiani, E., Mazzini, G., & Racchi, M. (2012). Searching for predictive blood biomarkers: misfolded p53 in mild cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res*, 9(10), 1191-1197. doi:10.2174/156720512804142886
- Tangestani Fard, M., & Stough, C. (2019). A Review and Hypothesized Model of the Mechanisms That Underpin the Relationship Between Inflammation and Cognition in the Elderly. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11(56). doi:10.3389/fnagi.2019.00056
- Tangyuenyongwatana, P., & Gritsanapan, W. (2014). Prasapalai: An essential Thai traditional formulation for primary dysmenorrhea treatment. *Tang Humanitas Medicine*, 4(2), 1-8.
- Tao, J., Cui, Y., Duan, Y., Zhang, N., Wang, C., & Zhang, F. (2017). Puerarin attenuates locomotor and cognitive deficits as well as hippocampal neuronal injury through the PI3K/Akt1/GSK-3 β signaling pathway in an in vivo model of cerebral ischemia. *Oncotarget*, 8(63), 106283-106295. doi:10.18632/oncotarget.22290
- Tasleem, F., Azhar, I., Ali, S. N., Perveen, S., & Mahmood, Z. A. (2014). Analgesic and anti-inflammatory activities of Piper nigrum L. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7, S461-S468.
- Theerachayanan, T., Sirithunyalug, B., & Piyamongkol, S. (2007). Antimalarial and antimycobacterial activities of dimeric Naphthoquinone from Diospyros glandulosa and Diospyros rhodocalyx. *CMU J Nat Sci*, 6, 253-258.
- Tran, H. H. T., Nguyen, M. C., Le, H. T., Nguyen, T. L., Pham, T. B., Chau, V. M., . . . Nguyen, T. D. (2014). Inhibitors of α -glucosidase and α -amylase from Cyperus rotundus. *Pharmaceutical Biology*, 52(1), 74-77.
- Tsai, Y.-T., Kao, S.-T., & Cheng, C.-Y. (2022). Medicinal Herbs and Their Derived Ingredients Protect against Cognitive Decline in In Vivo Models of Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11311. doi:10.3390/ijms231911311
- Tsilosani, A., Gao, C., & Zhang, W. (2022). Aldosterone-Regulated Sodium Transport and Blood Pressure. *Frontiers in Physiology*, 13. doi:10.3389/fphys.2022.770375
- Vago, D. R., Wallenstein, G. V., & Morris, L. S. (2014). Hippocampus. In M. J. Aminoff & R. B. Daroff (Eds.), *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)* (pp. 566-570). Oxford: Academic Press.

- von Bernhardt, R., Eugenin-von Bernhardt, L., & Eugenin, J. (2015). Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*, *7*, 124. doi:10.3389/fnagi.2015.00124
- Wang, C., & Slikker Jr, W. (2017). *Neural Cell Biology*: CRC Press.
- Wang, J., Cui, Y., Yu, Z., Wang, W., Cheng, X., Ji, W., . . . Yang, X. (2019). Brain Endothelial Cells Maintain Lactate Homeostasis and Control Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Stem Cell*, *25*(6), 754-767.e759. doi:10.1016/j.stem.2019.09.009
- Wang, S., Tong, Y., Ng, T. B., Lao, L., Lam, J. K., Zhang, K. Y., . . . Sze, S. C. (2015). Network pharmacological identification of active compounds and potential actions of Erxian decoction in alleviating menopause-related symptoms. *Chin Med*, *10*, 19. doi:10.1186/s13020-015-0051-z
- Wang, W., & Hu, W. (2018). Salvianolic acid B recovers cognitive deficits and angiogenesis in a cerebral small vessel disease rat model via the STAT3/VEGF signaling pathway. *Mol Med Rep*, *17*(2), 3146-3151. doi:10.3892/mmr.2017.8203
- Winterhalter, C., Widera, P., & Krasnogor, N. (2014). JEPETTO: a Cytoscape plugin for gene set enrichment and topological analysis based on interaction networks. *Bioinformatics*, *30*(7), 1029-1030. doi:10.1093/bioinformatics/btt732
- World Health Organization. (2019). Dementia. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., . . . Cao, D. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res*, *49*(W1), W5-w14. doi:10.1093/nar/gkab255
- Yao, J., Wei, W., Wen, J., Cao, Y., & Li, H. (2023). The efficacy and mechanism of berberine in improving aging-related cognitive dysfunction: A study based on network pharmacology. *Front Neurosci*, *17*, 1093180. doi:10.3389/fnins.2023.1093180
- Yusoff, M., Hamid, H., & Houghton, P. (2014). Anticholinesterase Inhibitory Activity of Quaternary Alkaloids from *Tinospora crispa*. *Molecules*, *19*(1), 1201-1211. doi:10.3390/molecules19011201
- Zeng, Q., Li, L., Siu, W., Jin, Y., Cao, M., Li, W., . . . Wu, Z. (2019). A combined molecular biology and network pharmacology approach to investigate the multi-target mechanisms of

- Chaihu Shugan San on Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*, *120*, 109370. doi:10.1016/j.biopha.2019.109370
- Zeng, X., Zhang, P., He, W., Qin, C., Chen, S., Tao, L., . . . Chen, Y. Z. (2018). NPASS: natural product activity and species source database for natural product research, discovery and tool development. *Nucleic Acids Res*, *46*(D1), D1217-d1222. doi:10.1093/nar/gkx1026
- Zhai, Z., Tao, X., Alami, M. M., Shu, S., & Wang, X. (2021). Network Pharmacology and Molecular Docking Combined to Analyze the Molecular and Pharmacological Mechanism of *Pinellia ternata* in the Treatment of Hypertension. *Current Issues in Molecular Biology*, *43*(1), 65-78.
- Zhang, J., Akihisa, T., Kurita, M., Kikuchi, T., Zhu, W.-F., Ye, F., . . . Xu, J. (2018). Melanogenesis-Inhibitory and Cytotoxic Activities of Triterpene Glycoside Constituents from the Bark of *Albizia procera*. *Journal of natural products*, *81*(12), 2612-2620. doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00167
- Zhang, R., Zhu, X., Bai, H., & Ning, K. (2019). Network Pharmacology Databases for Traditional Chinese Medicine: Review and Assessment. *Frontiers in pharmacology*, *10*, 123. doi:10.3389/fphar.2019.00123
- Zhang, W. (2016). Network pharmacology: A further description. *Network Pharmacology*, *1*(1), 1-14.
- Zhao, H., Yang, Y., Wang, S., Yang, X., Zhou, K., Xu, C., . . . Chen, Y. Z. (2022). NPASS database update 2023: quantitative natural product activity and species source database for biomedical research. *Nucleic Acids Res*, *51*(D1), D621-D628. doi:10.1093/nar/gkac1069
- Zhou, Y., Zhu, L., Li, H., Xie, W., Liu, J., Zhang, Y., . . . Wang, C. (2022). In vivo and in vitro neuroprotective effects of maca polysaccharide. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *27*(1), 8. doi:10.31083/j.fbl2701008
- Zille, M., Farr, T. D., Przesdzing, I., Müller, J., Sommer, C., Dirnagl, U., & Wunder, A. (2012). Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *J Cereb Blood Flow Metab*, *32*(2), 213-231. doi:10.1038/jcbfm.2011.150

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	สุจิตา โอภาณี
วัน เดือน ปี เกิด	20 เมษายน 2533
สถานที่เกิด	จังหวัดนนทบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	จังหวัดสุรินทร์
ตำแหน่งและประวัติการทำงาน	อาจารย์ วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี
ประวัติการศึกษา	2557 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พัฒนการมนุษย์) 2554 แพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต (การแพทย์แผนไทยประยุกต์)

