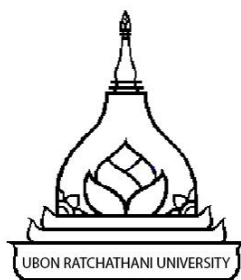




ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากจิ้งหรีดสายพันธุ์ทองดำต่อโรคอัลไซเมอร์

พัชรภรณ์ บุญศิลป์

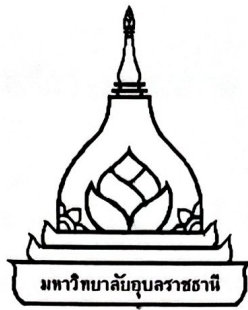
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์  
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
ปีการศึกษา 2562  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF *GEYLLUS BIMACULATUS*  
EXTRACTS ON ALZHEIMER'S DISEASE

PATCHRAPON BOONSIN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCES  
MAJOR IN BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES  
FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES  
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY  
ACADEMIC YEAR 2019  
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์

เรื่อง ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจิ้งหรีดสายพันธุ์ทองดำต่อโรคอัลไซเมอร์

ผู้วิจัย นางสาวพัชรภรณ์ บุญศิลป์

คณะกรรมการสอบ

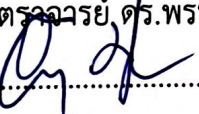
|                                                    |               |
|----------------------------------------------------|---------------|
| ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา | ประธานกรรมการ |
| ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ไวกูณิ               | กรรมการ       |
| ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทนา บุญยะรัตน์            | กรรมการ       |
| ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริมา สุวรรณกุล จันทะมา     | กรรมการ       |
| ดร.สลิล มิ่งมัลย์รักษ์                             | กรรมการ       |

อาจารย์ที่ปรึกษา

  
.....

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ไวกูณิ)

  
.....

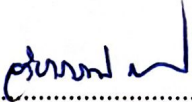
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทนา บุญยะรัตน์)

  
.....

(ดร.ศักดิ์สิทธิ์ ศรีภา)

คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

  
.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2562

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาเป็นอย่างสูงจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ไวกูม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทนา บุญยะรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ และความช่วยเหลือต่าง ๆ จนกระทั่งลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านเป็นอย่างสูง ณ ที่นี้ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปริชา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริมา สุวรรณบุญ จันทะมา และ ดร. สลิล มิ่งมาลัยลักษณ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางการไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ได้ช่วยเหลือในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้กำลังใจ ส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการศึกษาที่ดี คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากการศึกษาครั้งนี้ ขอมอบแด่ผู้ที่อยู่เบื้องหลังในการส่งเสริมความสำเร็จทั้งที่ได้กล่าวนามถึงและมิได้กล่าวนามถึงทุกท่าน และขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้ความรู้ที่เกี่ยวข้องในการศึกษานี้ พร้อมทั้งสนับสนุนสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์เพื่อให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีและขอบพระคุณครอบครัวสำหรับความห่วงใยและกำลังใจที่มีให้ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ และสนับสนุนทุนการศึกษาจนทำให้สำเร็จลุล่วงลุล่วงไปด้วยดี

พัชราภรณ์ บุญศิลป์

ผู้วิจัย

## บทคัดย่อ

เรื่อง :ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจิ้งหรีดสายพันธุ์ทองดำต่อโรคอัลไซเมอร์  
 ชื่อผู้วิจัย : พัทธราภรณ์ บุญศิลป์  
 ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต  
 สาขาวิชา : เภสัชศาสตร์ชีวภาพ  
 อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรทิพย์ ไวกุล  
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทนา บุญยะรัตน์  
 คำสำคัญ : โรคอัลไซเมอร์, จิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ, เบต้าอะมัยลอยด์, อนุมูลอิสระ, แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส,

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงแนวโน้มในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ของสารสกัดจากจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ 3 กลุ่ม ได้แก่ สารสกัดจิ้งหรีดด้วยเอทานอล สารสกัดจิ้งหรีดด้วยน้ำ และสารสกัดจิ้งหรีดด้วย phosphate buffer saline ต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ โดยทำการศึกษาทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในเซลล์เพาะเลี้ยง (*cell culture*) ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำทั้ง 3 กลุ่ม มีฤทธิ์ดีในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> และ DPPH<sup>•</sup> สารสกัดจากจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำทั้ง 3 กลุ่ม ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส เมื่อทดสอบด้วยวิธี Ellman's method รวมทั้งมีฤทธิ์ดีในการต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีน เบต้าอะมัยลอยด์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี thioflavin T assay โดยสารสกัดจิ้งหรีดที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์ได้ในช่วงร้อยละ 31.11 – 58.08 และ 30.58 – 60.10 ตามลำดับ สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ดีที่สุดโดย มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดีที่สุดที่ 50.03 และ 60.10 ที่ ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับการศึกษากิจกรรมต้านการทำลายเซลล์ประสาทในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำทั้ง 3 กลุ่ม มีฤทธิ์ป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเบต้าอะมัยลอยด์ และผลการศึกษาจาก Western blotting assay ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดมีฤทธิ์ป้องกันการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยผ่านการกระตุ้นการแสดงออกของ anti-apoptotic protein ได้แก่ Bcl-xl Mcl-1 และ survivin ส่งผลต่อการป้องกันการตัดของ caspase-9 และ caspase-3 นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเติมฟอสเฟตให้กับ apoptosis protein ได้แก่ JNK Akt และ p38 ผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ผ่านหลายกลไก ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์ และฤทธิ์ป้องกันการทำลายเซลล์

ประสาทจากภาวะเครียดออกซิเดชันและเบต้าอะมัยลอยด์ ดังนั้นสารสกัดจากจิงหรีดพันธุ์ทองคำ  
น่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคอัลไซเมอร์

## ABSTRACT

TITER : PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF *GRYLLUS*  
*BIMACULATUS* EXTRACTS ON ALZHEIMER 'S DISEASE

AUTHOR : PATCHRAPON BOONSIN

DEGREE : MASTER OF SCIENCE PROGRAM

MAJOR : BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES

ADVISOR : ASST. PROF DR.PORNTHIP WAIWUT Ph.D

CO-ADVISOR : ASST. PROF DR.CHANTANA BOONYARAT Ph.D

KEYWORDS : ALZHEIMER'DISEASE, *GRYLLUS BIMACULATUS*, BETA-AMYLOID,  
 OXIDATION, ACETYLCHOLINESTERASE

In searching for a promising candidate for treatment of Alzheimer, the effects of o3 extracts from ethanol, deionized water and phosphate buffer extracts of cricket (*Gryllus bimaculatus*) on pathological cascade of Alzheimer's disease (AD) were investigated by *in vitro* and cell culture model. The results exhibited that all cricket extracts showed an ability to scavenge both 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals. The result from Ellman's method indicated that the extracts could not inhibit acetylcholinesterase function. In addition, for thioflavinT assay which studies an effect on  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) aggregation indicated that all cricket extracts at the concentration of 1 and 10 mg/mL were able to inhibit  $A\beta$ 1-42 aggregation with inhibitory percentage ranging from 31.11 – 50.03 and 30.58 - 60.10, respectively. The water extract of cricket showed the most potent activity with inhibitory percentage of 50.03 and 60.10 at the concentration of 1 and 10 mg/mL, respectively. From the neuroprotection study in cell culture revealed that all cricket extracts could reduce human neuroblastoma cell (SH-SY5Y) death induced by  $H_2O_2$  and  $A\beta$ . Moreover, the result from Western blotting analysis indicated that cricket extracts inhibited  $H_2O_2$  -induced cell death via stimulating the expression of anti-apoptotic proteins including Bcl-xL, Mcl-1 and survivin resulting in inhibiting of caspase 3 and caspase 9 cleavage activation and reducing in the phosphorylation of apoptosis protein including JNK, Akt and p38. The overall results indicated that the cricket extract

possesses multimode of action involved with AD pathology cascade including antioxidant, anti-  $A\beta$  aggregation, and neuroprotection against oxidative stress and  $\beta$ -amyloid. Thus, the cricket extract might be a potential candidate for further developing as drug or dietary supplement for Alzheimer's Disease

## สารบัญ

|                                                                                                                  | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                                                                                                  | ก    |
| บทคัดย่อภาษาไทย                                                                                                  | ข    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ                                                                                               | ง    |
| สารบัญ                                                                                                           | ฉ    |
| สารบัญตาราง                                                                                                      | ฅ    |
| สารบัญภาพ                                                                                                        | ญ    |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ                                                                                     | ฐ    |
| <b>บทที่ 1 บทนำ</b>                                                                                              |      |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ                                                                                       | 1    |
| 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย                                                                                         | 2    |
| 1.3 สมมติฐานการวิจัย                                                                                             | 3    |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ                                                                                    | 3    |
| <b>บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>                                                                    |      |
| 2.1 โรคอัลไซเมอร์                                                                                                | 4    |
| 2.2 จิ้งหรีด                                                                                                     | 18   |
| <b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย</b>                                                                                |      |
| 3.1 การเตรียมสารสกัดจิ้งหรีด                                                                                     | 29   |
| 3.2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH<br>(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals; DPPH assay)       | 30   |
| 3.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS<br>(2,2 azino-bisethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)       | 31   |
| 3.4 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเตอเรส<br>โดยวิธี modified Ellman's spectrophotometric method | 33   |
| 3.5 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกิด amyloid aggregation<br>ด้วยวิธี thioflavin T assay                            | 34   |
| 3.6 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อเซลล์ประสาท<br>โดยวิธี MTT assay                                  | 35   |

## สารบัญ (ต่อ)

|                                                                                                                                                         | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 3.7 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจิ้งหรีดในการป้องกันการทำลายเซลล์<br>ประสาทโดยการเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์ โดยวิธี MTT assay                                  | 36   |
| 3.8 ทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ<br>oxidative stress อันเนื่องจาก hydrogen peroxide โดยวิธี MTT assay                               | 38   |
| 3.9 ศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตาย<br>ของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide โดยวิธี<br>Western blotting analysis | 39   |
| <b>บทที่ 4 ผลการทดลอง</b>                                                                                                                               |      |
| 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH<br>(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals; DPPH assay)                                            | 40   |
| 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS<br>(2,2 azino-bisethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)                                            | 42   |
| 4.3 ผลของสารสกัดจิ้งหรีดต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส<br>(acetylcholinesterase)                                                        | 44   |
| 4.4 ผลการทดสอบความสามารถของสารทดสอบใน<br>การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ beta Amyloid ในสารสกัดจิ้งหรีด                                                       | 45   |
| 4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อเซลล์ประสาท SHSY-Y                                                                                     | 47   |
| 4.6 ผลการศึกษาสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อฤทธิ์การป้องกันการถูกทำลายของเซลล์<br>ประสาท SHSY-5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์                         | 48   |
| 4.7 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อในการป้องกันการทำลายของเซลล์ประสาท<br>SHSY-5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์                                           | 51   |
| 4.8 การศึกษาผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อโปรตีนที่ทำให้เกิดการตาย<br>แบบอะพอพโทซิสของเซลล์ประสาท SHSY-5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย<br>ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์       | 52   |
| 4.9 การศึกษาสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อโปรตีนที่ทำให้เกิดการตาย<br>แบบอะพอพโทซิสในเซลล์ประสาท SHSY-5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์                       | 56   |

## สารบัญ (ต่อ)

|                                                                                                                                                      | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>บทที่ 5 อภิปรายการทดลอง</b>                                                                                                                       |      |
| 5.1 การศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากจิ้งหรีด                                                                                              | 59   |
| 5.2 การศึกษาสารสกัดจากจิ้งหรีดในการป้องกันการทำลายเซลล์<br>ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์                                             | 61   |
| 5.3 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากจิ้งหรีดในการยับยั้งการทำงานของ<br>เอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส                                                        | 62   |
| 5.4 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อการต้านการเกาะ<br>กลุ่มของโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์                                                             | 62   |
| 5.5 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากจิ้งหรีดในการป้องกันการทำลายเซลล์<br>ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะมัยลอยด์                                          | 63   |
| 5.6 การศึกษาผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อโปรตีนในวิถีการตายแบบ<br>อะพอพโทซิสของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์<br>และเบต้าอะมัยลอยด์ | 64   |
| <b>สรุปและอภิปรายผลการทดลอง</b>                                                                                                                      |      |
| <b>เอกสารอ้างอิง</b>                                                                                                                                 | 68   |
| <b>ภาคผนวก</b>                                                                                                                                       | 79   |
| <b>ประวัติผู้วิจัย</b>                                                                                                                               | 83   |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                       | หน้า |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2.1      | พลังงานและองค์ประกอบหลักของแมลงที่กินได้ ในน้ำหนักสด 100 กรัม                         | 24   |
| 2.2      | ส่วนประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นในแมลงที่กินได้ (มิลลิกรัม / กรัมโปรตีน)                  | 25   |
| 2.3      | ส่วนประกอบของกรดอะมิโนไม่จำเป็นในแมลงที่กินได้ มิลลิกรัม/กรัมโปรตีน                   | 26   |
| 2.4      | ปริมาณคอเลสเตอรอลและกรดไขมันของแมลงที่กินได้ในน้ำหนักส่วนที่<br>รับประทานได้ 100 กรัม | 27   |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |                                                                                                                                                      | หน้า |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2.1    | การตัด Protein ของ Amyloid Precursor (APP)                                                                                                           | 8    |
| 2.2    | การสลายตัวของ Tau Protein                                                                                                                            | 10   |
| 2.3    | การลดลงของสารสื่อประสาท Acetylcholine                                                                                                                | 11   |
| 2.4    | การเกิดภาวะ Oxidative stress                                                                                                                         | 13   |
| 2.5    | โครงสร้างของ Donepezil                                                                                                                               | 14   |
| 2.6    | โครงสร้างของ Rivastigmine                                                                                                                            | 15   |
| 2.7    | โครงสร้างของ Galantamine                                                                                                                             | 15   |
| 2.8    | โครงสร้างของ Memantine                                                                                                                               | 16   |
| 2.9    | กระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส                                                                                                                    | 17   |
| 2.10   | รูปร่างลักษณะของจิ้งหรีด (เพศเมีย)                                                                                                                   | 20   |
| 2.11   | วงจรชีวิตของจิ้งหรีด                                                                                                                                 | 22   |
| 3.1    | การปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระ DPPH                                                                                                                   | 31   |
| 3.2    | การทำปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระ ABTS                                                                                                                 | 32   |
| 4.1    | ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH                            | 40   |
| 4.2    | ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ (DI) ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH                           | 41   |
| 4.3    | ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย phosphate - buffered saline (PBS) ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH | 41   |
| 4.4    | ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารโพลีฟีนอล ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH                                                    | 42   |
| 4.5    | ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS                            | 43   |
| 4.6    | ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยสกัด DI ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS                                | 43   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                        | หน้า |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 4.7    | ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS                                                                                                                 | 44   |
| 4.8    | ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารโพลีฟีนอลต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS                                                                                                                                       | 44   |
| 4.9    | แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของ tacrine ต่อการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส                                                                                                                                | 45   |
| 4.10   | ผลของสารสกัดจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ 3 กลุ่ม ได้แก่ สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ (DI) สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย phosphate buffer (PBS) สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล (EtOH) จากจิ้งหรีดต่อ aggregation ของเบต้าอะมีลอยด์     | 46   |
| 4.11   | ผลของสารสกัดจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ 3 กลุ่ม ได้แก่ สารสกัดน้ำจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ (DI) สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย phosphate buffer (PBS) และสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล (EtOH) ต่อการต้านการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมีลอยด์ | 47   |
| 4.12   | ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อความเป็นพิษเซลล์ประสาท SH-SY5Y                                                                                                                       | 48   |
| 4.13   | ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 1,10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท SH-SY5Y เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์                                                         | 49   |
| 4.14   | ผลของสารสกัดเอทานอลจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท SH-SY5Y เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์                                                 | 50   |
| 4.15   | ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ (DI) ที่ความเข้มข้น 1,10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท SH-SY5Y เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์                                                        | 51   |
| 4.16   | ผลของสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย Phosphate-buffered saline (PBS) เอทานอล (EtOH) และน้ำ (DI) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากเบต้าอะมีลอยด์                                                 | 52   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่                                                                                                                                                                                                                    | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 4.18 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS (Phosphate-buffered saline) ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโทซิสเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ | 55   |
| 4.19 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ DI ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโทซิสเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์                           | 56   |
| 4.20 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอานอล DI และ PBS ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโทซิสเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะมัยลอยด์                               | 57   |
| ก.1 นำจิ้งหรีดมาล้างทำความสะอาดก่อนนำไปอบ                                                                                                                                                                                 | 80   |
| ก.2 Evaporator ของสารสกัดจิ้งหรีด                                                                                                                                                                                         | 80   |
| ก.3 หมักจิ้งหรีดด้วยเอทานอล                                                                                                                                                                                               | 81   |
| ก.4 กรองเอากากของจิ้งหรีดออก                                                                                                                                                                                              | 81   |
| ก.5 Freeze-dried ของสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS                                                                                                                                                                        | 82   |
| ก.6 Freeze-dried ของสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย DI                                                                                                                                                                         | 82   |

## คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

| สัญลักษณ์และอักษรย่อ | ความหมาย                                         |
|----------------------|--------------------------------------------------|
| IC <sub>50</sub>     | ค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งออกซิเดชันได้ 50 % |
| ND                   | ไม่สามารถวัดหาค่าได้                             |
| SD                   | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน                              |
| Aβ                   | เบต้าอะมัยลอยด์                                  |
| DI                   | Deionized water                                  |
| PBS                  | Phosphate-buffered saline                        |
| mg/kg/day            | มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อหนึ่งวัน                  |
| EtOH                 | เอทานอล                                          |
| SH-SY5Y              | human neuroblastoma cell                         |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคสมองเสื่อม (Dementia) ชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อย ซึ่งเกิดจากการตายของเซลล์สมอง ทำให้การทำงานของสมองเสื่อมลง จนกระทั่งส่งผลกระทบต่อกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วย ซึ่งในช่วง 8 - 10 ปี หลังจากเริ่มมีอาการของโรคอัลไซเมอร์ และผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษา ผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะมีอาการสมองเสื่อมรุนแรงยิ่งขึ้น จนกระทั่งไม่สามารถปฏิบัติกิจวัตรประจำวันตามปกติ (อารี ตัญเจริญรัตน์, 2553) โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่รุนแรงและเป็นสาเหตุของการตายในลำดับต้น ๆ ของผู้สูงอายุในหลายประเทศเช่นในประเทศสหรัฐอเมริกา (Alzheimer's Association, 2010) และอุบัติการณ์การเกิดโรคอัลไซเมอร์ในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกมีลักษณะที่เป็นไปในแนวทางเดียวกัน โดยพบว่าประมาณร้อยละ 2-4 ของผู้ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี จะเป็นโรคนี้ และผู้หญิงจะเป็นมากกว่าผู้ชายในอัตราส่วน 3:1 จากรายงานการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกามีการคาดประมาณผู้ที่ป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น โดยความชุกของโรคประมาณร้อยละ 0.5 ที่อายุ 65 ปี และมีการอาการปรากฏให้เห็นภายหลังอายุ 60 ปีจะเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณทุกช่วงเวลา 5 ปีจนถึงอายุ 80-90 ปี สำหรับในประเทศไทยจะพบผู้ป่วยอัลไซเมอร์ในช่วงอายุ 60-64 ปี ประมาณร้อยละ 1-2 ช่วงอายุ 70-74 ปี พบร้อยละ 12 และช่วงอายุ 80-84 ปีพบร้อยละ 31 ของประชากรไทย (สถาบันประสาทวิทยา, 2551) เนื่องจากปัจจุบันประชากรส่วนใหญ่มีอายุยืนยาวขึ้น (Larson et al., 2013) ภาวะสมองเสื่อมจึงเป็นสาเหตุของการไร้ความสามารถในผู้สูงอายุมากที่สุด ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อภาวะสุขภาพของผู้สูงอายุ ซึ่งภาวะที่เกิดขึ้นจากการดูแลผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมจะมีค่าใช้จ่ายสูงขึ้นตามระยะของโรคที่รุนแรงขึ้น (ปวีณา นพโสธร และ รังสิมันต์ สุนทรไชยา, 2558) และจากการศึกษาที่ผ่านได้มีการค้นหาพืชสมุนไพรต่าง ๆ มาใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ เช่น สารสกัดจากใบบัวบก (Chien-Li Chen et al., 2016) ใบแป๊ะก๊วย (Xu Liu et al., 2015) พรมมิ *Bacopa monniera* (Sharma et al., 1987) ว่านน้ำ *Acorus calamus* L (Oh et al., 2004) มีการใช้การรักษาาร่วมกันระหว่าง erythropoietin และ curcumin ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (Doaa et al., 2015) และยังมีสมุนไพรอีกหลายชนิดที่ช่วยป้องกันการและรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้

จิงหรีดจัดเป็นสมุนไพรประเภทสัตรีวัตถุ จิงหรีดเป็นแมลงที่ผู้คนนิยมนำมาบริโภคอย่างแพร่หลาย ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อาจนำจิงหรีดมาใช้เป็นยาเพื่อรักษาอาการไข้และโรคความดันโลหิตสูง และในปัจจุบันนี้จิงหรีดถือว่าเป็นยา (Cui et al., 2002) ในจิงหรีดพบว่ามีองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุต่าง ๆ จิงหรีดมีกรดไขมันที่สำคัญ เช่น กรด oleic, linoleic และ  $\gamma$ -linoleic

(Ahn et al.2000) ซึ่งเป็นไขมันกลุ่ม โอเมก้า 6 ที่ช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจ โดยการลดการแข็งตัวของเลือด ลดการจับกลุ่มของเกล็ดเลือด และลดอัตราการเกิดโรคความดันโลหิตสูง ลดการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง และป้องกันโรคสมองเสื่อม หรือ โรคอัลไซเมอร์ (Lee et al., 2009; Oliver et al., 2010) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสารสกัดจิ้งหรีดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น จิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำหรือ ethanol มีฤทธิ์ในการขับสารพิษออกจากตับโดยมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH) และ acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) ( Lee et al., 2004) มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยมีผลเพิ่มระดับ IL 4, IFN- $\gamma$ , และ TNF- $\alpha$  (Seo et al., 2004) มีผลลดระดับ total lipid และ total cholesterol ในตับของหนูทดลอง (Hwang et al., 2004) นอกจากนั้นจิ้งหรีดยังมีฤทธิ์ต้านอาการบวม (anti-edema effect) และต้านการเกิดออกซิเดชัน (anti-oxidation) ในระดับ DNA ซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคอัลไซเมอร์ โดยการลดระดับของ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) และเพิ่มการแสดงออกของยีน reticulon 4 (Rtn 4) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในหนูทดลอง (Ahn et al, 2015) รวมทั้งมีผลกระตุ้นการทำงานของ antioxidant enzyme ได้แก่ catalase, superoxide dismutase และ glutathione S-transferase (Taufek et al., 2016) จากข้อมูลด้านฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจิ้งหรีดและฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบของจิ้งหรีด จึงคาดว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดน่าจะมีศักยภาพในการป้องกันหรือรักษาอัลไซเมอร์ได้

ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ การศึกษาฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเตอเรส ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ ฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทอันเนื่องจากภาวะเครียดออกซิเดชัน และเนื่องจากพิษของเบต้าอะมัยลอยด์ รวมทั้งศึกษาผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ประสาท

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ในด้านออกซิเดชันของสารสกัดจิ้งหรีด

1.2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจิ้งหรีดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

แอซิติลโคลีนเอสเตอเรส

1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์

1.2.5 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจิ้งหรีดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทอันเนื่องจากพิษของเบต้าอะมัยลอยด์

1.2.6 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจิ้งหรีดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ

oxidative stress อันเนื่องจาก hydrogen peroxide

- 1.2.7 เพื่อศึกษาผลของจิ้งหรีด ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide และเบต้าอะไมลอยด์ โดยวิธี Western blotting analysis

### 1.3 สมมุติฐานงานวิจัย

สารสกัดจากจิ้งหรีดสายพันธุ์ทองดำมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ข้อมูลทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ของสารสกัดจากจิ้งหรีด รวมไปถึงกลไกการออกฤทธิ์

1.4.2 สามารถนำสารสกัดจากจิ้งหรีดนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมหรือยารักษาโรคอัลไซเมอร์ได้ในอนาคต

1.4.3 สามารถส่งเสริมให้เกษตรกรมีรายได้ในครัวเรือนเพิ่มมากขึ้นจากการเพาะเลี้ยงจิ้งหรีด

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 โรคอัลไซเมอร์

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) เป็นโรคความจำเสื่อม (dementia) ที่พบบ่อย โดยคิดเป็น 50 - 60% ของโรคความจำเสื่อมทั้งหมด ซึ่งในปัจจุบันมีประชากรทั่วโลกป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์ ประมาณ 35 ล้านคน (Querfurth et al., 2010) ปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ คือ อายุ โดยอุบัติการณ์การเกิดโรคอัลไซเมอร์จะเพิ่มขึ้น 2 เท่าในทุก ๆ 5 ปีที่อายุเพิ่มขึ้นในผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป และในปัจจุบันนี้ผู้คนมีอายุที่ยืนยาวมากขึ้นซึ่งมีการคาดการณ์ว่าจำนวนของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่าในอีก 40 ปีข้างหน้า (Ferri CP et al., 2005)

ภาวะความจำเสื่อม (Dementia) เป็นโรคที่มีความสลับซับซ้อนมากชนิดหนึ่งที่พบในมนุษย์และพบว่ามีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วในประชากรผู้สูงอายุทั่วโลก ซึ่งในประเทศสหรัฐอเมริกามีการรายงานเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ ว่าเป็นสาเหตุการเสียชีวิตเป็นอันดับ 5 ในผู้หญิง และอันดับ 8 ในผู้ชายที่มีอายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไป (Hoyert et al., 2005 ) และใน ค.ศ. 2007 มีการรายงานว่า ประเทศสหรัฐอเมริกามีผู้ป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์มากถึง 5 ล้านคน และอาจจะเพิ่มมากขึ้นเป็น 16 ล้านคน ในอีก 40 ปีข้างหน้า จากอุบัติการณ์การเกิดโรคอัลไซเมอร์ ในประเทศทางแถบซีกโลกตะวันตก พบว่าโรคอัลไซเมอร์จะเกิดกับผู้สูงอายุเป็นส่วนใหญ่ โดยอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคเพิ่มขึ้นตามอายุ จากบุคคลที่มีอายุ 60-64 ปี มีอัตราเสี่ยงประมาณ 1-3% บุคคลที่มีอายุมากกว่า 65 ปี มีอัตราเสี่ยง 6-8% และเพิ่มขึ้นเป็น 30-40 % ในบุคคลที่อายุมากกว่า 85 ปี (Walsh and Selkoe., 2004) ภาวะสมองเสื่อมเป็นโรคที่แสดงถึงการเสื่อมสภาพของสมอง สติปัญญา จนส่งผลกระทบต่อความเป็นอยู่ในชีวิตประจำวัน และต่อสังคมรอบด้าน ในอดีตมีการศึกษาค้นคว้าถึงความเป็นไปของโรคอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งใน ค.ศ.1980 จึงทราบรายละเอียดของภาวะสมองเสื่อมชัดเจนมากยิ่งขึ้น และสามารถแบ่งภาวะสมองเสื่อมออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ ด้วยกันคือ ภาวะสมองเสื่อมชนิดแรก คือ โรคอัลไซเมอร์ คือ ภาวะสมองเสื่อมที่พบมากที่สุดโดยคิดเป็นร้อยละ 50 ของผู้ป่วยภาวะสมองเสื่อมทั้งหมด ภาวะสมองเสื่อมชนิดนี้จะมีอาการหลงลืม โดยจะลืมเรื่องที่เพิ่งเกิดขึ้นใหม่ ๆ ในชีวิตประจำวัน เช่น ลืมว่าวันนี้รับประทานอาหารเช้าหรือยัง ลืมว่าเคยพบใครในวันนี้ ชอบพูดซ้ำ ถามคำถามซ้ำๆ สติปัญญาและความเฉลียวฉลาดลดลง ทักษะต่าง ๆ เริ่มสูญเสียไป การดำเนินของโรคจะค่อยเป็นค่อยไป และทรุดลงในช่วงระยะเวลา 1-3 ปี โรคอัลไซเมอร์แบ่งออกตามอายุเริ่มแรกของโรค ซึ่งการแสดงออกของอาการของโรคได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ Familial Alzheimer's disease (early-onset disease) คือ ภาวะ

สมองเสื่อมที่พบได้ไม่บ่อยนัก ซึ่งพบได้น้อยกว่าร้อยละ 5 ของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ผู้ป่วยจะเริ่มแสดงอาการภาวะสมองเสื่อมก่อนอายุ 60 ปี สาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic mutations) บนโครโมโซมคู่ที่ 1, 14 และ 21 อีกชนิดหนึ่งคือ Sporadic Alzheimer's disease (late-onset disease) เป็นภาวะสมองเสื่อมที่พบได้มากกว่าชนิดแรก ซึ่งพบได้มากกว่าร้อยละ 95 ของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ผู้ป่วยจะเริ่มแสดงอาการของภาวะสมองเสื่อมเมื่อมีอายุมากกว่า 60 ปี การเกิดของโรคมีความสัมพันธ์กับความไว (susceptibility) ของ Apolipoprotein E (Apo E) gene ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 19 ซึ่งทำหน้าที่ผลิต Apolipoprotein E ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมและการขนส่งคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือด (Liu et al., 2000) ภาวะสมองเสื่อมชนิดที่สอง คือ ภาวะสมองเสื่อมจากโรคหลอดเลือดสมอง (Vascular Dementia, VD) คือภาวะสมองเสื่อมที่พบได้มากรองจากโรคอัลไซเมอร์ โดยคิดเป็นร้อยละ 20-25 ของผู้ป่วยภาวะสมองเสื่อมทั้งหมด ภาวะสมองเสื่อมชนิดนี้มีสาเหตุมาจากโรคที่เกี่ยวกับหลอดเลือดภายในสมอง (cerebrovascular disease) (Anonymous, 2005) ภาวะสมองเสื่อมที่เกิดจากทั้ง 2 สาเหตุข้างต้น คือ โรคอัลไซเมอร์และโรคหลอดเลือดสมอง (mixed dementia) พบได้ประมาณร้อยละ 5-10 ของผู้ป่วยภาวะสมองเสื่อมทั้งหมด ส่วนภาวะ สมองเสื่อมที่เกิดสาเหตุอื่น ๆ ซึ่งพบได้เพียงเล็กน้อย ได้แก่ โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease), dementia with Lewy bodies, สมองได้รับบาดเจ็บ (physical brain injury), Huntington's disease, Creutzfeldt-Jacob disease, frontotemporal dementia / Pick's disease, และ normal pressure hydrocephalus (Selkoe, 2005) อาการที่พบได้ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในระยะแรก คือการสูญเสียความจำระยะสั้น เช่น จำข้อมูลที่เรียนรู้เมื่อไม่นานมานี้ไม่ได้ เมื่อโรคดำเนินไประยะหนึ่ง ผู้ป่วยจะสูญเสียความจำระยะยาวมีความบกพร่องทางปัญญา (cognitive impairment) สูญเสียความสามารถทางภาษา มีพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น อารมณ์แปรปรวน หวาดระแวง หลงผิด เป็นต้น ต่อมาจะสูญเสียการทำงานต่าง ๆ ของร่างกายและเสียชีวิตในที่สุด โดยมากผู้ป่วยจะเสียชีวิตภายใน 3 – 9 ปี หลังจากได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคอัลไซเมอร์ (Querfurth et al., 2010) แม้ว่าจะมียาที่ได้รับการพัฒนาเพื่อรักษาโรคอัลไซเมอร์ แต่ยาเหล่านี้เป็นเพียงแค่ช่วยชะลอการดำเนินของโรคปัจจุบันยังไม่มียาที่สามารถรักษาโรคอัลไซเมอร์ให้หายขาดได้

### 2.1.1 อับัติการณ์ของโรคอัลไซเมอร์

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการทางสมองเสื่อมในผู้สูงอายุที่พบบ่อยที่สุดในโลกทางตะวันตก (Helbert et al., 2001) โรคนี้ในวันจะเป็นปัญหาเพิ่มขึ้นเพราะเป็นโรคที่พบในประชากรที่มีอายุมาก ในประเทศไทยพบอับัติการณ์ของโรคนี้ในผู้สูงอายุเพิ่มมากขึ้น ทำให้โรคอัลไซเมอร์ถูกจัดเป็นโรคที่เป็นที่สร้างปัญหาทางสาธารณสุขระดับสำคัญของประเทศ กล่าวว่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราการตาย หรือมีมาตรการป้องกันหรือการรักษาโรคสมองเสื่อมที่ได้ผล

จะมีจำนวนผู้สูงอายุที่ป่วยเป็นสมองเสื่อมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าทุก ๆ 20 ปี โดยเริ่มจาก 24 ล้านคน ใน ค.ศ.2001 เป็น 40 ล้านคนและ 81 ล้านคน ใน ค.ศ.2020 และ 2040 ตามลำดับในประเทศ สหรัฐอเมริกามีการรายงานไว้ว่า โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นภาวะสมองเสื่อมที่เป็น สาเหตุการเสียชีวิตเป็นอันดับ 5 ในผู้หญิง และอันดับ 8 ในผู้ชาย ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี ตามลำดับ (Hoyert et al., 2005) จากการรายงานของ Alzheimer's Disease International ในปี ค.ศ. 2008 มีการคาดการณ์ว่าประชากรโลกที่อยู่ในภาวะสมองเสื่อมมีอยู่ประมาณ 30 ล้านคน ในแต่ละปีจะมี ประชากรโลกที่เกิดภาวะสมองเสื่อมเพิ่มมากขึ้นปีละ 4.6 ล้านคนประมาณ และมีผู้ป่วยภาวะสมอง เสื่อมเพิ่มขึ้น 1 คนในทุก ๆ 7 วินาที (Anonymous, 2008) ในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของโรคนี้ใน ผู้สูงอายุเพิ่มมากขึ้นเช่นกันจากผลการสำรวจสุขภาพอนามัยของประชาชนไทยด้วยการตรวจ ร่างกายโดยสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุขใน พ.ศ. 2547 พบผู้สูงอายุ 60 ปีขึ้นไป มีปัญหาสมองเสื่อม (Dementia) 30% โดยในผู้สูงอายุชาย พบ 24% ส่วนผู้หญิงพบ 35% และยิ่งพบมากเมื่ออายุสูงขึ้น โดยพบในภาคใต้มากที่สุด 33% รองลงมาคือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 31% ภาคเหนือและภาคกลาง พบ 26% ในเขตกรุงเทพมหานครพบ 18% และยังพบว่าโรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่พบบ่อยที่สุด ประมาณ 60% ของโรคสมองเสื่อมของผู้สูงอายุทำให้โรคอัลไซเมอร์ถูกจัดเป็นโรคที่เป็นที่สร้างปัญหา ทางสาธารณสุขระดับสำคัญของประเทศ

### 2.1.2 อาการโรคอัลไซเมอร์

พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ และเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยสูญเสียความทรงจำมีพฤติกรรมเปลี่ยนไป จนไม่สามารถดูแลตนเองได้ อาการของผู้ป่วยอาจแบ่งได้เป็น 4 ระยะ

ระยะที่ 1 ผู้ป่วยจะเริ่มมีปัญหาเรื่องของความทรงจำมีอาการลืมในเรื่องเล็ก ๆ น้อย ๆ โดยเฉพาะเรื่องที่เพิ่งเกิดขึ้น ในขณะที่ความทรงจำในอดีตยังดีอยู่ผู้ป่วยจะดูเชื่องช้าลง ไม่กระฉับกระเฉง เริ่มจำหนทาง หรือจำชื่อคนบางคนไม่ได้ในช่วงนี้ผู้ป่วยอาจมีอาการง่วงง่าย หรือ ซึมเศร้า การดูแลผู้ป่วยในระยะนี้เริ่มตั้งแต่การให้เวลาผู้ป่วยในการตอบคำถาม หรือการตอบสนองกับ สิ่งรอบข้างเนื่องจากผู้ป่วยจะเชื่องช้าลงจากการทำงานของสมองที่เสียไป ควรจะช่วยให้ผู้ป่วยคลาย ความกังวลโดยบอกขั้นตอนทีละลำดับช้า ๆ เพื่อให้ผู้ป่วยทำตามได้และควรจัดให้ผู้ป่วยได้พักผ่อนเป็น ช่วง ๆ จะทำให้ผู้ป่วยอารมณ์ดีขึ้น

ระยะที่ 2 ผู้ป่วยจะเริ่มมีปัญหาในการตัดสินใจ อาจคิดหรือพูดอะไรซ้ำ ๆ เริ่มมีปัญหาเรื่อง การรับรู้ เช่น ผู้ป่วยอาจจะทำน้ำร้อนลวกมือตนเองแล้วมองบาดแผลเฉย ๆ โดยไม่เข้าใจว่าทำไมจึงเกิด เหตุการณ์นี้ขึ้น นอกจากนี้ยังสูญเสียความสามารถทางคำพูด ไม่สามารถบ่งบอกในสิ่งที่ตนเองคิดหรือ เข้าใจผ่านทางภาษาได้ การดูแลผู้ป่วยในระยะนี้ ควรดูแลผู้ป่วยอย่างใกล้ชิดมากขึ้น โดยจัดกิจวัตร ประจำวันให้กับผู้ป่วย เพื่อให้ผู้ป่วยปรับตัวได้ง่ายขึ้น บางครั้งควรทบทวนในสิ่งที่ผู้ป่วยพูด และเน้นสรุปในสิ่งที่ผู้ป่วยต้องการจะสื่อ เพื่อช่วยให้การสื่อสารมีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น

การใช้ปฏิทินตัวใหญ่ ๆ การแขวนนาฬิกาให้ผู้ป่วยเห็นได้ง่าย นอกจากนี้ญาติและครอบครัวของผู้ป่วย ต้องช่วยกันสังเกต และประเมินในเรื่องความสามารถด้านต่าง ๆ และพฤติกรรมของผู้ป่วย โดยเทียบกับพฤติกรรมเดิม เพื่อให้ทราบความสามารถที่ลดลงในด้านต่าง ๆ ซึ่งจะช่วยให้จัดกิจกรรมที่เหมาะสมกับผู้ป่วยในช่วงนั้น ๆ ได้

ระยะที่ 3 ผู้ป่วยมีความบกพร่องในเรื่องความรู้ความสามารถมากขึ้น ไม่สามารถจดจำสถานที่ต่างๆ เริ่มมีบกพร่องในการดูแลสุขอนามัยของตนเอง และไม่สามารถทรงตัวได้ดีในขณะยืนหรือเดิน ในระยะนี้ผู้ป่วยอาจมีอาการโรคจิตหวาดระแวง หรือมีหูแว่ว บางรายอาจจะก้าวร้าวรุนแรง ปัสสาวะรด ไม่สนใจตนเองการดูแลผู้ป่วยในระยะนี้จะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยเป็นสำคัญ ญาติจะต้องคอยดูแล และปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับความสามารถของผู้ป่วยที่ถดถอยลง ในรายที่มีอาการโรคจิต หูแว่ว จำเป็นต้องพบแพทย์ และรับประทานยาเพื่อควบคุมพฤติกรรมที่เป็นปัญหา

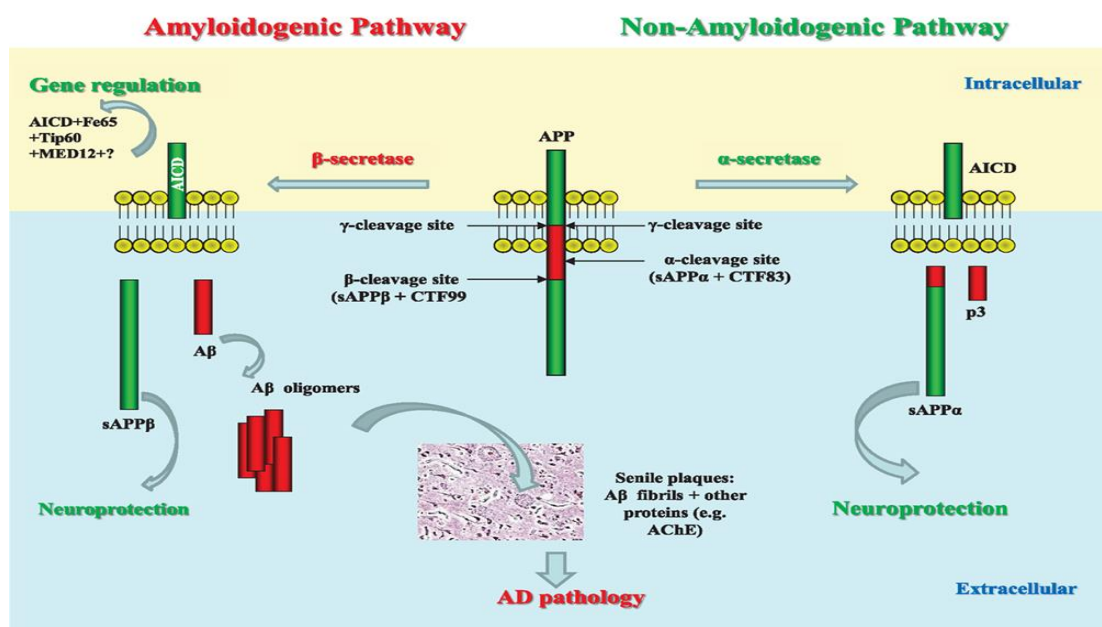
ระยะที่ 4 ผู้ป่วยอาจออกจากบ้าน เร่ร่อนบ่อยขึ้น และอาจมีพฤติกรรมซ้ำ ๆ หรือพูดซ้ำๆ นอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องการขับถ่ายที่ไม่เป็นที่ เป็นทางผู้ป่วยอาจจะจำใครไม่ได้เลย หรือจำเรื่องราวบางสิ่งได้เป็นนาที และลืมภายในไม่กี่นาที การดูแลผู้ป่วยระยะนี้ จำเป็นต้องดูแลใกล้ชิดตลอดเวลา เนื่องจากผู้ป่วยไม่สามารถดูแลตนเองได้เลย รวมถึงเรื่องกิจวัตรประจำวัน เช่น การรับประทานอาหารเช้า ซึ่งผู้ป่วยอาจเคี้ยวหรือกลืนอาหารเองไม่ได้ การเตรียมอาหารที่บดหยาบและไม่เหลวจนเกินไป จะช่วยให้ผู้ป่วยรับประทานได้ง่ายขึ้นพยายามป้อนน้ำทีละน้อย แต่บ่อยขึ้นเพื่อลดภาวะขาดน้ำนอกจากนี้การดูแลเรื่องการขับถ่ายเป็นสิ่งสำคัญต้องพยายามพาผู้ป่วยเข้าห้องน้ำให้ถี่ขึ้น เพื่อลดการถ่ายเรี่ยราด รวมทั้งเรื่องการดูแลความสะอาดของร่างกาย เพื่อป้องกันการติดเชื้อทางผิวหนังการดำเนินโรคอาการจะเริ่มเป็นเมื่ออายุ 65 ปี แต่บางรายเป็นเร็วกว่านั้นอาจจะเริ่มเมื่ออายุ 40 ปี อาการเริ่มเป็นใหม่ ๆ จะมีอาการซีด และสูญเสียสมาธิ ซึ่งอาการแรก ๆ อาจจะวินิจฉัยยากเพราะอาการนี้ก็เหมือนกับผู้สูงอายุเป็นส่วนใหญ่ การดำเนินโรคจะค่อยเป็นค่อยไปและทรุดลงในช่วงระยะ 1-3 ปี มีปัญหาเรื่องวันเวลา สถานที่ และอาจหลงทางกลับบ้านไม่ถูก ลืมชื่อญาติสนิท หวาดระแวงสับสนโดยเฉพาะกลางคืน อาจไม่นอนทั้งคืน จะออกนอกบ้าน และมีพฤติกรรมก้าวร้าว บางคนก็กลับเปลี่ยนไป เป็นไม่สนใจสิ่งแวดล้อม งดงานอดิเรกที่เคยทำ เช่น เก็บกวาดต้นไม้ หรือดูทีวี อ่านหนังสือพิมพ์ ส่วนหนึ่งเพราะดูและอ่านไม่ค่อยเข้าใจ คิดคำนวณไม่ได้ ใช้จ่ายทองเงินไม่ถูก เมื่อเวลาผ่านไปอีก 2-3 ปี อาการยิ่งทรุดหนัก ความจำลดลงมาก จำญาติไม่ได้ เคลื่อนไหวช้าลง ไม่ค่อยยอมเดิน หรือเดินก็เหมือนก้าวขาไม่ออก มีอาการลังเล ทำกิจวัตรประจำวันด้วยตนเองไม่ได้ เช่น อาบน้ำ แปรงฟัน รับประทานอาหาร พูดน้อยลง พูดไม่เป็นประโยค เมื่อความจำเสื่อมมากขึ้นเรื่อย ๆ ในที่สุดผู้ป่วยก็ไม่พูดเลย กลั้นปัสสาวะอุจจาระไม่ได้ ต้องมีคนดูแลตลอด 24 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะเสียชีวิตในเวลา 2-10 ปี โดยเฉลี่ย 10 ปี ด้วยโรคแทรกซ้อน เช่น ติดเชื้อจากปอดบวม หรือแผลกดทับ

### ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคอัลไซเมอร์

- (1.) ความชรา พบโรคอัลไซเมอร์มักจะเป็นกับคนอายุ 65 ปีขึ้นไป
  - (2.) เชื้อชาติ พบได้ทุกเชื้อชาติ
  - (3.) เพศ พบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย
  - (4.) พันธุกรรม พบว่าคนเป็นโรคอัลไซเมอร์จะมีประวัติครอบครัวเป็นโรคนี้ด้วย
- ประมาณร้อยละ 30 – 40 (อัญชลี ชุ่มทอง, 2551)

### 2.1.3 พยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์

#### 2.1.3.1 การสะสมของเบต้าอะไมลอยด์



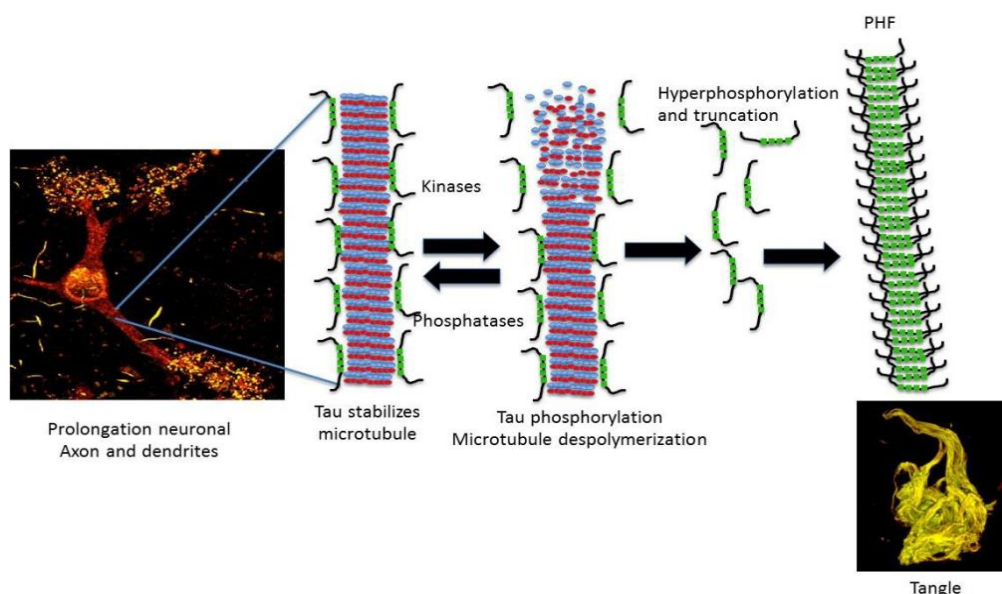
ภาพที่ 2.1 การตัดของ Amyloid Precursor Protein (APP)

ที่มา: David A. Hicks et al. (2012)

สมมติฐาน “amyloid hypothesis” (Tanzi RE and Bertram L., 2005) เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญของ amyloid plaques คือ Beta amyloid (A $\beta$ ) ซึ่งเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 40 หรือ 42 ตัวเปปไทด์เหล่านี้ได้มาจากการเมแทบอลิซึมของโปรตีน amyloid precursor protein (APP) ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ  $\beta$ -secretase ( $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1 หรือ BACE-1) และ  $\gamma$ -secretase (เป็นโปรตีนเชิงซ้อนประกอบด้วยโปรตีน presenilin1 และ presenilin 2 ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา) A $\beta$ <sub>1-40</sub> เป็นเปปไทด์ ที่พบมากกว่าแต่มีความเป็นพิษน้อยกว่า A $\beta$ <sub>1-42</sub> นอกจากนี้โปรตีน APP ยังสามารถถูก

เมแทบอลิซึม ได้ด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -secretase และ  $\beta$ -secretase ซึ่งในกรณีที่ถูกตัดด้วย  $\alpha$ -secretase นี้จะทำให้เกิดการสร้างอะมัยลอยด์เปปไทด์สายสั้น ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ และไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ถ้าตัดด้วย  $\beta$ -secretase จะทำให้เกิดการสร้างอะมัยลอยด์เปปไทด์สายยาว ซึ่งไม่สามารถละลายน้ำได้ จึงทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกัน และขัดขวางการส่งสารอาหารไปเลี้ยงสมอง ทำให้สมองฝ่อ และเสื่อมลง (ดังภาพที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของ APP ที่ไม่สมดุลระหว่างการสร้าง และการกำจัดออกของ  $A\beta$  เป็นสาเหตุที่ทำให้มีการสะสมของ  $A\beta$  และ การที่มี  $A\beta$  ที่มากเกินไปนี้เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ “Amyloid hypothesis” เป็นสมมติฐานที่น่าสนใจเนื่องจากยีนที่สร้างโปรตีน APP อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 21 และผู้ป่วยที่มีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 แห่ง (trisomy 21) ดังที่พบในผู้ป่วยที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์ (Down syndrome) ทั้งหมดล้วนแสดงอาการของโรคอัลไซเมอร์เมื่ออายุประมาณ 40 ปี (Lott IT and Head E, 2005) และ มีหลักฐานยืนยันจากงานวิจัยพบว่าการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน *Psn-1* (ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน presenilin 1), *Psn-2* (ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน presenilin 2), และ *APP* (ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน APP) (Haass C and De Strooper B, 1999) เป็นผลทำให้มีการกระตุ้นให้มีการสร้าง  $A\beta$  ที่มากเกินไปจะมีผลทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ชนิดเกิดเร็ว (early-onset familial Alzheimer’s disease, FAD) หรือ ที่เรียกว่าอัลไซเมอร์ชนิด familial นอกจากนี้ยังมียีนอื่นที่เป็นยีนที่มีความเสี่ยงต่อการเกิด และโรคอัลไซเมอร์ชนิดเกิดช้า (late-onset Alzheimer’s disease) หรือที่เรียกว่า อัลไซเมอร์ชนิด sporadic เช่น ยีน *ApoE* โดยพบว่าคนที่มี *ApoE*  $\epsilon 4$  alleles จะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคอัลไซเมอร์มากกว่าคนที่มี *ApoE*  $\epsilon 3$  alleles ถึง 7 เท่า กลไกที่ทำให้ยีน *ApoE*  $\epsilon 4$  alleles ส่งเสริมให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่ายีน *ApoE*  $\epsilon 4$  alleles มีผลทำให้การกำจัดออกของ  $A\beta$  ลดลง จากหลักฐานที่กล่าวมานี้ ทำให้เชื่อว่าการสะสมของ  $A\beta$  เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์

### 2.13.2 การสะสมของ neurofibrillarytangles



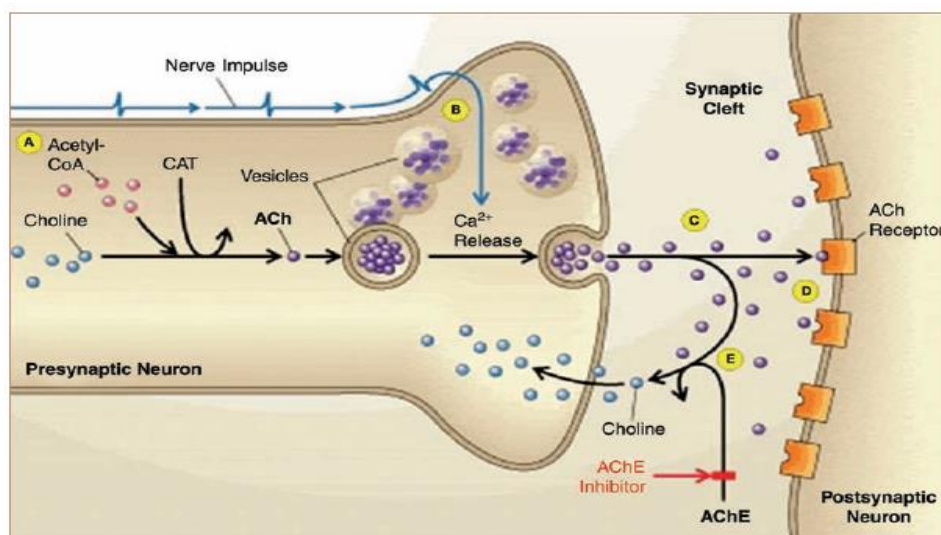
ภาพที่ 2.2 การสลายตัวของ Tau Protein

ที่มา: José Luna-Muñoz et al. (2013)

นอกจาก amyloid plaques แล้วยังพบการเกิด neurofibrillarytangles ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์โดย neurofibrillarytangles เกิดจากการเกาะกลุ่มกันของโปรตีน tau ที่ถูกการเติมฟอสเฟตมากเกินไป (hyperphosphorylated microtubule-associated tau) (Grundke-Iqbal I and et al., 1986) ซึ่งเมื่ออยู่ในสภาวะปกติจะพบโปรตีน tau มากที่บริเวณ axon โดยโปรตีน tau เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ช่วยค้ำจุนและรักษาเสถียรภาพของ microtubule แต่ถ้าหากอยู่ในสภาวะที่มีความผิดปกติจะมีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับโปรตีน tau มากผิดปกติเรียกว่าเกิด hyperphosphorylation มีผลทำให้ความสามารถของโปรตีน tau ในการจับกับ microtubule ลดลงทำให้โปรตีน tau แยกตัวออกมาจาก microtubule ส่งผลให้มีการสลายตัวของ microtubule มีผลทำให้ระบบการขนส่งในเซลล์ประสาทผิดปกติไป และทำให้เซลล์ประสาทตายในเวลาต่อมา ส่วนโปรตีน tau ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไป และแยกตัวออกมาจาก microtubule จะมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและจะเกิดการเกาะกลุ่มกัน (aggregation) กลายเป็น paired helical filament และในที่สุดจะเกิดการรวมกลุ่มกันกลายเป็น neurofibrillary tangles ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (แสดงดังภาพที่ 2) และยังพบว่า การเกิด neurofibrillary tangles เกิดหลังจากที่มีการสะสมของ A $\beta$  (Small SA and et al. 2008) กล่าวคือเมื่อมีการสะสมของ A $\beta$  ที่มากเกินไปจนเกิดความเป็นพิษจะมีผลกระทบทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน tau จนกลายมาเป็น neurofibrillary

tangles ซึ่งสอดคล้องตามสมมติฐาน “amyloid hypothesis” ที่กล่าวว่าการสะสมของ A $\beta$  เป็นปัจจัยสำคัญในการปลุกต้นการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์

### 2.13.3 การลดลงของสารสื่อประสาท Acetylcholine



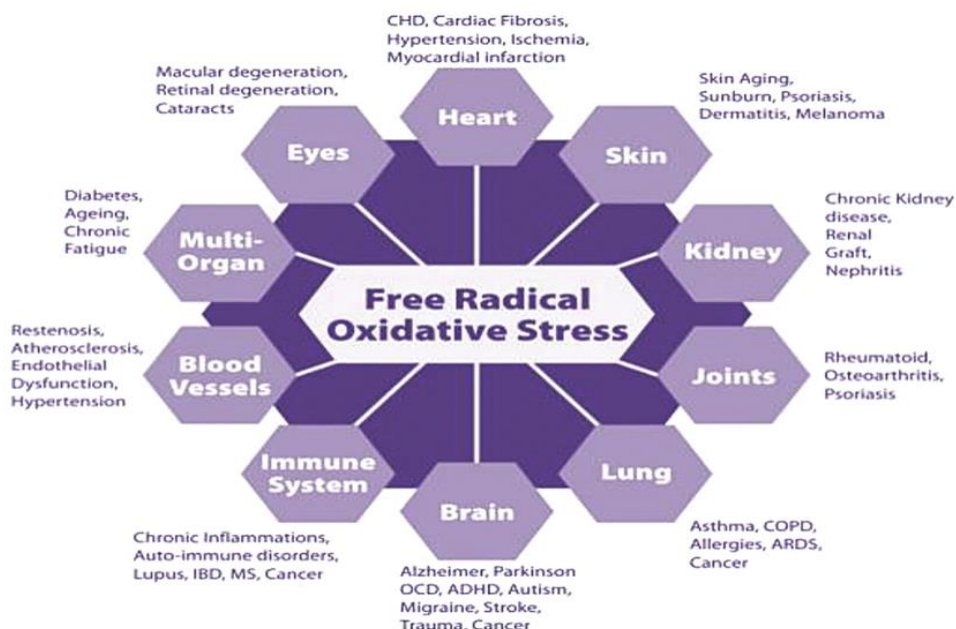
ภาพที่ 2.3 การลดลงของสารสื่อประสาท Acetylcholine

ที่มา: Bonpong (2009)

จากสมมติฐาน cholinergic hypothesis ซึ่งระบุว่าการสูญเสียการทำงานของ cholinergic ในระบบประสาทส่วนกลางก่อให้เกิดการลดลงความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับอายุขั้นสูง และ AD (Bartus, 2000) ซึ่งสารสื่อประสาทมีอยู่หลายชนิดเช่น แอซิติลโคลีน (acetylcholine, ACh) ซีโรโทนิน (serotonin) โดปามีน (Dopamine) หรือกาบ้า ซึ่งทำหน้าที่แตกต่างกันออกไป โดปามีน (dopamine) ในสมองที่ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทจะกระตุ้นโดปามีนรีเซปเตอร์ (dopamine receptor) ในระบบประสาทซิมพาเทติก (sympathetic nervous system) ทำให้อัตราการเต้นของหัวใจ และความดันโลหิตเพิ่มขึ้น นอกจากนี้โดปามีนยังมีบทบาทเป็นฮอร์โมนที่หลั่งโดยไฮโปทาลามัส (hypothalamus) เพื่อยับยั้งการหลั่งโปรแลคติน (prolactin) จากต่อมพิทูอิทารีส่วนหน้า (anterior lobe of the pituitary) แต่เพิ่มการหลั่งฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโต (growth hormone) บทบาทของโดปามีน จะทำหน้าที่ในการควบคุมอารมณ์ การเรียบเรียงความนึกคิด การทำหน้าที่ของสมองในการควบคุมการเคลื่อนไหว ซึ่งถ้ามีการเสียสมดุลระหว่างแอซิติลโคลีน กับโดปามีน จะทำให้เป็นโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) ซีโรโทนิน (Serotonin) เป็นสารสื่อประสาทที่ทำหน้าที่สำคัญในการแข็งตัวของเลือด ซึ่งอาจทำให้เกิดอาการปวดหัวไมเกรนในบางราย เพราะทำให้เส้นเลือดหดและขยายตัว ขณะเดียวกันก็มีบทบาทสำคัญต่อการเต้นของหัวใจ การควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย การ

รับรู้ความรู้สึก และเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ต่าง ๆ ของสมอง เช่น การหลับช่วยในการเริ่มเข้าสู่การหลับ ความตื่นตัว ความอยากอาหาร และความจำ โดยเฉพาะความจำระยะสั้น จะทำงานสัมพันธ์กับโดปามีน และเกี่ยวกับพฤติกรรมทางเพศ GABA มีหน้าที่เป็น neurotransmitter ยับยั้งในสมอง ซึ่งมีผลโดยตรงต่อคุณภาพและความสามารถในการจัดการกับความเครียด GABA สามารถช่วยให้เกิดการนอนหลับที่ดีขึ้นเพราะมันช่วยในการผ่อนคลายของสมอง ซึ่งเมื่อสมองมีปฏิกิริยาเกี่ยวกับความตื่นตัว GABA ก็จะช่วยกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า เพื่อให้ร่างกายปล่อยฮอร์โมนการเจริญเติบโตของมนุษย์ ทำให้นอนหลับดีขึ้น หากเกิดการขาด GABA จะทำให้เกิดความกังวล อาการปวดหัว ความดันเลือดสูง หงุดหงิด และเกิดอาการชัก ซึ่งโดยปกติ แอซิติลโคลีน ทำหน้าที่ทั้งในศูนย์หน่วยความจำของสมองเช่นเดียวกับส่วนสำคัญของระบบประสาทส่วนปลายเช่นในกล้ามเนื้อเรียบของระบบย่อยอาหาร (Feldberg W and Lin, 1950) เป็น parasympathetic neurotransmitter ที่ลดช่วยลดอัตราการเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจ และส่งเสริมการพักผ่อนการฟื้นฟูการระบบสืบพันธุ์และการขับถ่าย การที่ที่ระดับ acetylcholine ต่ำจะทำให้เกิดปัญหาหน่วยความจำทั้งสองและฟังก์ชันการย่อยอาหารที่ลดลง acetylcholine เกิดจากการจับกันของ choline และ acetyl CoA ได้เป็น acetylcholine จะถูกเก็บไว้ใน synaptic vesicle เมื่อมีการกระตุ้นของระบบประสาทมากเกินไปจะทำให้แอซิติลโคลีน จะถูกปลดปล่อยออกมาที่บริเวณ synaptic cleft และแอซิติลโคลีน ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะจับกับ cholinergic receptor ที่บริเวณ post-synaptic จึงเกิดการส่งกระแสประสาทเกิดขึ้น แต่ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์กลับพบว่ามีความระดับของแอซิติลโคลีนลดลงอย่างมาก การลดลงของระดับแอซิติลโคลีน อาจเกิดจากการทำลายแอซิติลโคลีน โดยเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE) มากเกินไป หรืออาจเกิดจากการสังเคราะห์แอซิติลโคลีนจาก choline และ acetyl CoA ด้วยเอนไซม์ โคลีนแอซิติลทรานเฟอร์เรส (choline acetyltransferase: ChAT) ลดลง รวมถึงการลดลงของ cholinergic receptor การลดระดับของแอซิติลโคลีนจะทำให้เกิดการขัดขวางการส่งกระแสประสาทจึงทำให้ ผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีปัญหาเกี่ยวกับหน่วยความจำและฟังก์ชันการย่อยอาหารที่ลดลงแสดงให้เห็น (ดังภาพที่ 2.3)

#### 2.13.4 ภาวะเครียดออกซิเดชัน



ภาพที่ 2.4 การเกิดภาวะ Oxidative stress

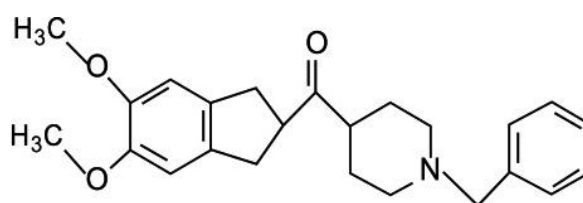
ที่มา: Asma Nisar et al. (2017)

อนุมูลอิสระ (free radical หรือ oxidant) คือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอยู่รอบนอก ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีในลักษณะเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้าง ในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่ องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) การเปลี่ยนสภาพโปรตีน และไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) กับโปรตีน หรือ เอนไซม์บางชนิดจนทำให้การทำงานของโปรตีน หรือ เอนไซม์เหล่านั้น ผิดปกติ (Ames and *et al.*, 1993) เป็น สาเหตุสำคัญของโรคหลายชนิด (Nakabeppu et al., 2006; Valko et al., 2007) รวมไปถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ ซึ่งพบว่าในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะพบปริมาณของ free radical เยอะกว่าคนปกติในสมองส่วน hippocampus ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ใช้ในการเรียนรู้และความจำ free radical นี้จะทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์สมองเกิดและการตายของสมองจึงส่งผลให้ผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีความจำที่ลดน้อยลงน้อยลงได้ (Dennis W. Dickson, 2004)

## 2.1.4 ยาที่ใช้ในการรักษา

ยาที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันมี 2 กลุ่ม

2.1.4.1 ยากลุ่ม Acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ แอซิติลโคลีนบรีเวอร์รอยต่อประสาท (synaptic cleft) ยานี้จึงเพิ่มระดับของแอซิติลโคลีนในสมอง และอาจมีผลดีในด้านอื่น เช่น ลดการเกิด amyloid precursor protein ป้องกันผลจากอนุมูลอิสระ และการตายของเซลล์ประสาท ยากลุ่มนี้ได้รับการยอมรับจากคณะกรรมการอาหารและยาในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ในการใช้รักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในระยะเริ่มแรกถึงปานกลาง ซึ่งปัจจุบันมีใช้ 3 ชนิด ได้แก่ donepezil, rivastigmine และ galantamine (Sun et al., 2012)



Donepezil

### ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของ Donepezil

ที่มา: Luelak Lomlimand and Teerapat Nualnoi (2011)

#### 1) Donepezil

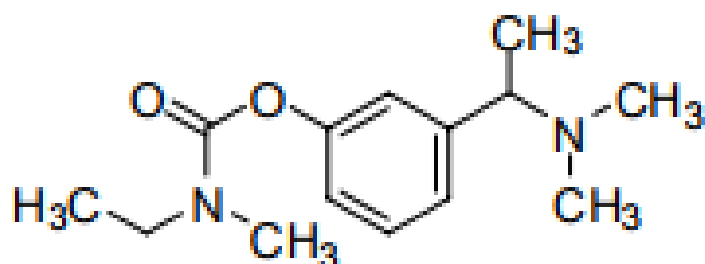
เป็นกลุ่มยารักษาโรคทางระบบประสาท ช่วยป้องกันการทำลายสารสื่อประสาทในสมอง เนื่องจากยานี้มีฤทธิ์จำเพาะต่อ acetylcholinesterase จากการศึกษพบว่า donepezil สามารถลดอัตราการพัฒนาจาก Mild Cognitive Impairment (MCI) ไปสู่ AD ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ยาชนิดอื่น ๆ ใช้ไม่ได้ผลใน MCI ยิ่งไปกว่านั้นมียารายงานว่าการใช้ galantamine ในผู้ป่วย MCI อาจเพิ่ม cardiovascular death (DeCarli et al., 2003)

อาการข้างเคียง ปวดกล้ามเนื้อ คลื่นไส้ โรคอุจจาระร่วง อาเจียน โรคนอนไม่หลับ และความเมื่อยล้า เป็นต้น

#### 2) Rivastigmine

ยานี้มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase ซึ่งมีการทำงานมากขึ้นในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ยานี้มีค่าครึ่งชีวิตสั้น แต่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ในระยะยาว แบบกึ่งถาวร (pseudo-irreversible) (Grossberg et al., 2013)

อาการข้างเคียงของการใช้ยา ผู้ป่วยจะมีอาการเบื่ออาหาร คลื่นไส้ น้ำหนักตัวลด ซึ่งการปรับขนาดยาอย่างช้า ๆ จะช่วยลดอาการข้างเคียงเหล่านี้ได้ (Di Santo SG et al., 2013)



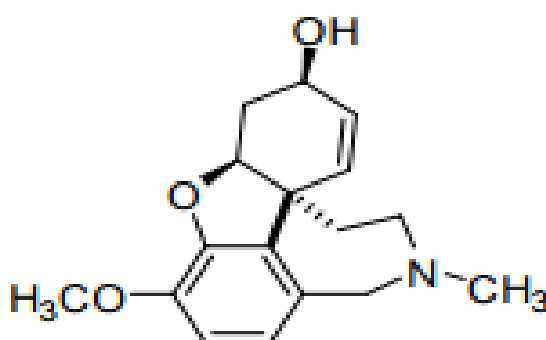
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของ Rivastigmine

ที่มา: Luelak and Teerapat (2011)

### 3) Galantamine

galanthamine ออกฤทธิ์โดยการจับกับ AChE เฉพาะในบริเวณ CAS จึงขัดขวาง ACh ไม่ให้เขามาถึงบริเวณ active site เป็นอัลคาลอยด์จาก *Galanthus nivalis* ซึ่งนอกจากมีฤทธิ์ AChEI แล้วยังสามารถกระตุ้น nicotinic ACh receptor (nAChR) ทั้งที่ pre- และ post-synaptic พบว่า ยาเกิดอันตรกิริยาที่ choline-binding site (Greenblatt *et al.* 1999)

อาการข้างเคียงของการใช้ยา galanthamine พบว่าผู้ป่วยจะมีอาการเบื่ออาหาร อาเจียน และน้ำหนักตัวลด (Farlow et al., 2005)



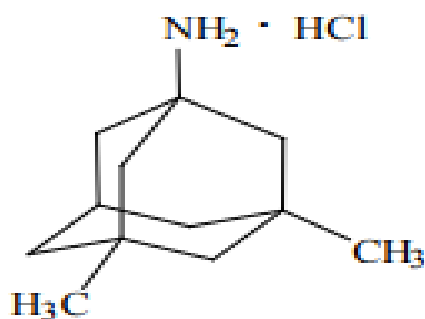
ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของ Galantamine

ที่มา: Luelak and Teerapat (2011)

2.1.4.2 ยากลุ่ม NMDA receptor antagonist ที่ถูกนำมาใช้รักษาอัลไซเมอร์ในทางคลินิก ได้แก่ memantine ซึ่งมีฤทธิ์เป็นทั้ง AChEI และ NMDA receptor antagonist Memantine

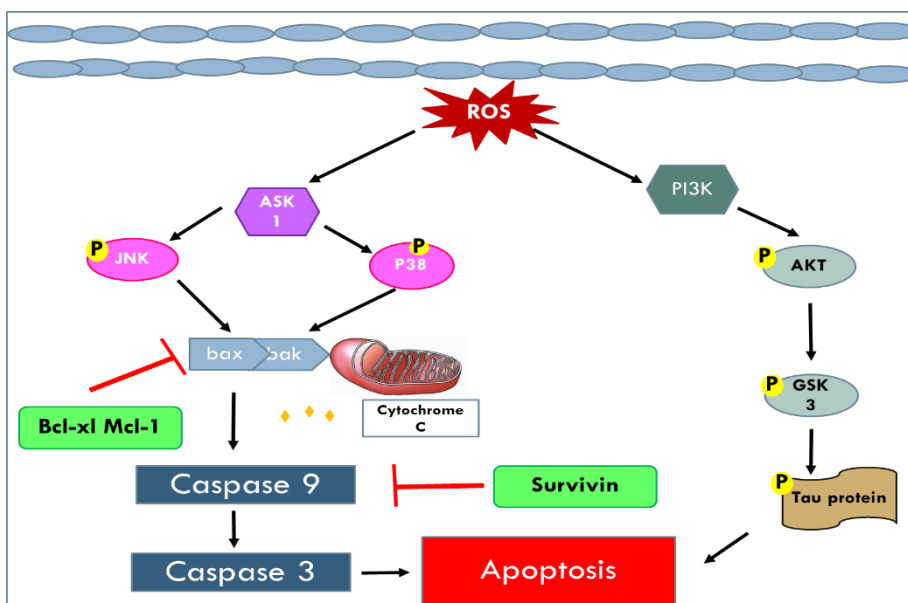
ยา Memantine ใช้รักษาภาวะสมองเสื่อมขั้นปานกลางถึงขั้นรุนแรงที่เกิดเนื่องจากโรคอัลไซเมอร์ได้มีการศึกษาผลของ memantine ในผู้ป่วย VaD ทั้งที่เป็น “Small vessel disease” or microlesions และ “Large vessel disease” or macrolesions เทียบกับยาหลอกพบว่า memantine สามารถยืดระยะเวลาในการเสื่อมลงของ cognition ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับยาหลอก โดยจะสามารถใช้ได้ดีกว่าในผู้ป่วยที่เป็น Small vessel disease (Ser et al., 1990) มีกลไกการยับยั้งเป็นแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive) และมีสัมพรรคภาพ (affinity) ในการจับกับตัวรับต่ำหรือปานกลาง รวมทั้งมีการจับและปล่อยกับตัวรับอย่างรวดเร็ว โดยการปรับการทำงานของระบบกลูตาเมตแบบจำเพาะที่มากเกินไป และไม่รบกวนการทำงานของเซลล์ประสาทที่ใช้กลูตาเมตในภาวะปกติซึ่งน่าจะมีผลดีในการปกป้องเซลล์ประสาทได้ด้วย (Massoud and Gauthier, 2010)

อาการข้างเคียงที่สำคัญของ Memantine ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน, hypertension, somnolence, confusion, hallucination, aggressive reaction, ataxia เป็นต้น (Farrimond et al., 2012 )



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของ Memantine

ที่มา: วิชา กมลสัมฤทธิ์ผล (2013)



ภาพที่ 2.9 กระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

### 2.1.5 การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

อะพอพโทซิส (Apoptosis) คือกระบวนการตายของเซลล์ในรูปแบบหนึ่งที่มีการโปรแกรมไว้แล้ว (programmed cell death) ของสิ่งมีชีวิตที่มีหลายเซลล์ เพื่อให้เกิดความสมดุลระหว่างการสร้างและการสลายตัวของเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวเคมี ที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างมีแบบแผน หรือกล่าวอย่างจำเพาะคือการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ในหลายรูปแบบ เช่นการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ การบวมของเซลล์ (blebbing) การเกิดการเหี่ยวของเซลล์ นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน โครมาตินมีความหนาตัวขึ้น และดีเอ็นเอเกิดการแตกหักเป็นท่อน กระบวนการกำจัดเศษซากเซลล์ที่ตายแล้วก็จะไม่ทำให้เกิดการกระตุ้นให้เนื้อเยื่อข้างเคียงเกิดความเสียหายซึ่งต่างจากการตายแบบการตายแบบเฉพาะส่วน หรือเนโครซิส (necrosis) ที่เกิดจากการขาดเลือดหรือการอักเสบซึ่งการตายในลักษณะนี้จะเป็นการตายแบบถาวรไม่สามารถซ่อมแซมหรือฟื้นฟูให้เป็นปกติได้ (Chiarugi et al. 2002) การตายแบบอะพอพโทซิสเกิดจากการกระตุ้นสัญญาณ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ การกระตุ้นสัญญาณจากภายนอกเซลล์ (extrinsic pathway) และ การกระตุ้นสัญญาณจากภายในเซลล์ (intrinsic pathway)

การได้รับการกระตุ้นสัญญาณจากภายนอกเซลล์ (extrinsic pathway) เกิดจากการที่มีสารเคมี หรือ UV เป็นต้น มากกระตุ้นทำให้เกิดการทำงานของ receptor ที่กระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์ได้ ซึ่งถูกเรียกว่า death receptor ได้แก่ TNF receptor, TRAIL receptor, RAF receptor

และ IL-1 receptor เมื่อ death receptor ทำงานและส่งสัญญาณเข้ามาในเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของ death receptor ทำให้ adaptor death receptor ในส่วยปลาย N-terminal ของ death receptor ที่อยู่ไนไซโตพลาสซึมไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis เช่น เมื่อ FAS มาจับกับ Fas Associated Via Death Domain (FADD) ทำให้เกิดการกระตุ้น procaspase-8 ทำให้เกิดการให้เกิดการเปลี่ยนมาเป็น caspase-8 ซึ่งอยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ เมื่อ caspase-8 ทำงานจะสามารถกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ได้ 2 ทาง ทางแรก คือ เมื่อ caspase-8 ทำงานจะเกิดการกระตุ้น procaspase-3 และ 7 ให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ และเมื่อ caspase-3 ทำงานจะเกิดการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ผ่านกระบวนการ apoptosis อีกทางหนึ่งคือ เมื่อ caspase 8 ทำงานจะเกิดการกระตุ้น bid ให้เปลี่ยนเป็น t-bid เมื่อ t-bid ทำงานจะไปกระตุ้นให้ bax และ bak แล้วเคลื่อนไปเกาะที่บริเวณผิวของไมโทคอนเดรียและทำให้เกิดการรั่วของ cytochrome-C แล้วไปรวมกับ Apaf-1 ทำให้เกิดการกระตุ้น procaspase-9 ให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ และจะไปกระตุ้น caspase-3 ทำงาน และกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสต่อไป

การกระตุ้นสัญญาณจากภายในเซลล์ (intrinsic pathway) เกิดจากการที่ดีเอ็นเอได้รับความเสียหาย การเกิด ER stress หรือ การมี oxidative stress ในเซลล์มากเกินไปทำให้ไมโทคอนเดรียเกิดการกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิส โดยผ่านโปรตีน p53 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ตรวจความเสียหายของ DNA เมื่อ DNA เกิดความเสียหาย จะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของโปรตีน p53 เพื่อเกิดการกระตุ้น NOXA และ PUMA .ให้ทำงานเมื่อ NOXA และ PUMA ทำงานจะเกิดการกระตุ้น bax และ bak ทำให้เกิดการจับของ cytochrome-Cแล้วไปรวมกับ Apaf-1 เพื่อกระตุ้น caspase-9 และ-3 ทำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสต่อไป และในสภาวะปกติที่ DNA ไม่ได้ได้รับความเสียหายจะมีโปรตีน Bcl-2 และ Bcl-xl มายับยั้งการทำงานของ bax และ bak นอกจากนั้นยังมีโปรตีน survivin ที่มาช่วยยับยั้งการทำงานของ caspase-9 ทำให้ไม่เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส

## 2.2 จิ้งหรีด

แมลงเป็นสัตว์ที่พบในโลกตั้งแต่ยุคดึกดำบรรพ์จนปัจจุบัน การรอดชีวิตอยู่เป็นเวลายาวนานของแมลงเกิดจากความสามารถในการปรับตัวและความสามารถในการแพร่พันธุ์ แมลงจึงเป็นสัตว์ที่มีจำนวนชนิดและปริมาณมากที่สุดในโลก โดยมีประชากรมากถึงร้อยละ 90 ของประชากรสัตว์ทั้งหมดที่พบบนโลก การมีแมลงปรากฏอยู่บนโลกตั้งแต่อดีตทำให้มนุษย์รู้จักการบริโภคแมลงมานาน การบริโภคแมลงพบได้ในหลายภูมิภาคของโลก เช่น ทวีปเอเชีย แอฟริกา และ อเมริกาใต้ การบริโภคแมลงในประเทศไทยมีมานาน นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ในปัจจุบันการบริโภคแมลงได้รับความนิยมทั่วประเทศ (ยุพา หาญบุญทรง

และคณะ, 2544) โดยพบว่าจิ้งหรีดเป็นหนึ่งในแมลงที่นิยมนำมารับประทาน และจิ้งหรีดมีการแพร่กระจายพันธุ์ตั้งแต่ยุโรป เอเชียตะวันตกเฉียงใต้จนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออก โดยดั้งเดิมเป็นสัตว์ท้องถิ่นของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่ไปแพร่กระจายพันธุ์ที่ยุโรปตั้งแต่ศตวรรษที่ 18 ด้วยการติดไปกับกระถางต้นไม้ในเรือสำเภาส่งสินค้า จากนั้นก็ได้แพร่ขยายพันธุ์ไปยังอเมริกาเหนือ ในประเทศไทยเกษตรกรนิยมทำฟาร์มจิ้งหรีดตั้งแต่ปี 2541 ปัจจุบันมีเกษตรกรเลี้ยงจิ้งหรีดเพิ่มขึ้นมากกว่า 20,000 ราย มีทั้งฟาร์มขนาดเล็กที่ผลิตขายภายในประเทศ รูปแบบของแมลงทอดและฟาร์มขนาดใหญ่ผลิตขายเพื่อเป็นสินค้าส่งออก โดยแปรรูปเป็นอาหารพร้อมรับประทาน เดิมเคยจับจากธรรมชาติแต่ได้ปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด จึงหันมาทำการเพาะเลี้ยงแทน (ทัศนีย์ จรรยา และคณะ, 2534)

"จิ้งหรีด" เป็นแหล่งของโปรตีน ซึ่งข้อมูลจากองค์การอาหารและการเกษตร ระบุไว้ว่า อนาคตการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกจะมากถึง 8,000 ล้านคน ในปี 2024 และมากถึง 9,000 ล้านคน ในปี 2050 ได้มีการประเมินว่า "แหล่งอาหารและ โปรตีนจะมีอย่างจำกัด" แหล่งอาหารทดแทนจึงเข้ามาแทนที่อาหารหลักเพราะประชากรที่เพิ่มขึ้นอาหารจึงไม่เพียงพอ การเลี้ยงแมลงจึงเป็น Novel Food (อาหารใหม่) ซึ่งประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตพืชผลทางการเกษตร มีระบบนิเวศอันสมบูรณ์ จึงเป็นเป้าหมายทางเลือกของผู้บริโภคทั่วโลก ขณะเดียวกันก็เป็นโอกาสของเกษตรกรไทยรวมถึงผู้ประกอบการสามารถเพิ่มช่องทางตลาด และนวัตกรรม อาหารใหม่

ในหลายปีที่ผ่านมา กรมส่งเสริมการเกษตรได้แนะนำให้เกษตรกรเลี้ยงแมลงเป็นอาชีพเสริมจากทำ การเกษตรหลักเช่น ปลูกข้าว ยางพารา ปาล์ม จากที่เกษตรกรเองเลี้ยงเป็นเพียงอาหารพื้นบ้าน (Traditional Food) ต่อมาทั่วโลกต่างสนใจแมลง เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แมลงสามารถผลิตโปรตีนที่ย่อยสลายได้ ในปริมาณมาก รวมถึงสารอาหารอื่นได้มากถึง 100 เท่า เปรียบเทียบกับการผลิตเนื้อวัว นอกจากนั้นยังใช้น้ำ น้อยกว่าปริมาณน้ำที่ต้องการใช้ในฟาร์มเลี้ยงวัว (DIPT., 2559)

### 2.2.1 ประโยชน์ของจิ้งหรีด

เนื่องจากจิ้งหรีดมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของคนและสัตว์ต่าง ๆ มากมาย อาทิ เป็นโปรตีนที่ย่อยง่าย จึงช่วยเสริมกล้ามเนื้อได้ดี มีแคลเซียมช่วยเสริมกระดูก น้ำมันช่วยบำรุงขน ไม่มีโคเรสเตอรอลและไขมันส่วนเกิน สารโคตินช่วยบำรุงเล็บของคน ขนของสัตว์ปีก และเปลือกของกุ้ง หอย ปู เป็นต้น ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจิ้งหรีดจึงเกิดประโยชน์ได้ในหลายลักษณะ ดังนี้

2.2.1.1 เพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์โดยตรง

2.2.1.2 เพื่อเป็นอาชีพเสริมรายได้ให้ครอบครัว

2.2.1.3 เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ในการประกอบอาชีพ

2.2.1.4 เพื่อการแปรรูปในอุตสาหกรรมอาหาร หรือเพื่อการผลิตในเชิงพาณิชย์

2.2.1.5 เพื่อเป็นอาหารสัตว์หรือส่วนผสมของอาหารสัตว์

2.2.1.6 เพื่อความเพลิดเพลิน

2.2.1.7 เพื่อใช้ในการกีฬา

2.2.1.8 เพื่อลดการใช้สารเคมี

2.2.1.9 เพื่อลดหรือกำจัดวัชพืช และเป็นการสร้างมูลค่าจากวัสดุเหลือทิ้ง

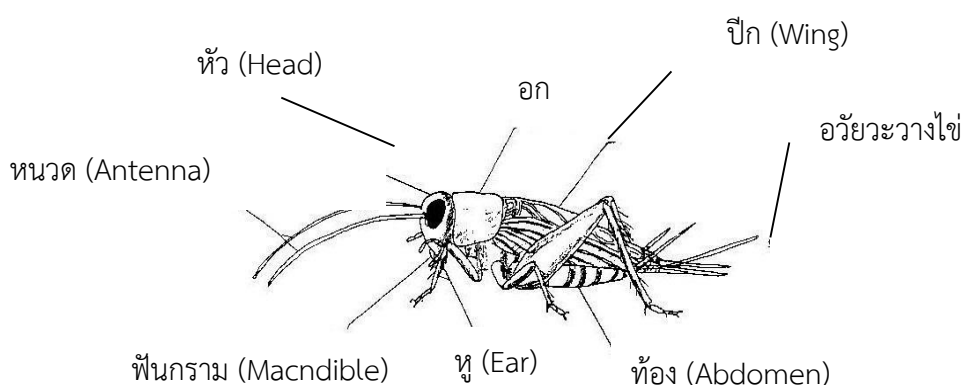
2.2.1.10 เพื่อหมักทำเป็นปุ๋ยน้ำ

2.2.1.11 เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรม

## 2.2.2 ชีวิตวิทยาของจิ้งหรีด

### รูปร่างลักษณะของจิ้งหรีด

จิ้งหรีดเป็นแมลงที่รูปร่างภายนอกเป็นปล้อง และห่อหุ้มร่างกายด้วยเปลือก (exoskeleton) ที่แข็งแรง ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากภายนอก ลำตัวประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนอก และ ส่วนท้อง ซึ่งแต่ละส่วนประกอบด้วยส่วนประกอบย่อย ๆ ดังนี้



ภาพที่ 2.10 รูปร่างลักษณะของจิ้งหรีด (เพคเมีย)

ที่มา: กรมส่งเสริมการเกษตร 2546

2.2.2.1 หัว (Head) ส่วนหัวของจิ้งหรีด ประกอบด้วย ตารวม 2 ตา ปากเป็นแบบกัด หนวดมีความยาวมากกว่าหรือเท่ากับ ความยาวของลำตัว หนวดเป็นแบบเส้นด้ายลักษณะเป็นปล้อง ๆ และ ทุกปล้องมีขนาดเกือบเท่ากัน คอเป็นส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างหัวกับอก ประกอบด้วยกล้ามเนื้อเพื่อช่วยให้ส่วนหัวเคลื่อนไหวได้สะดวก

2.2.2.2 อก (Thorax) อกมี 3 ปล้อง ประกอบด้วย อกปล้องแรกจะมีขาคู่หน้า 1 คู่ อกปล้องที่ 2 เป็นที่ตั้งของขาคู่กลาง 1 คู่ และปีกคู่หน้า จิ้งหรีดเพศผู้ปีกคู่หน้าจะมีลายหยักศกเป็นลายนก และทำให้เกิดเสียงเสียงโดยใช้ปีกคู่หน้าสีกัน ส่วนเพศเมียปีกมีผิวเรียบมีลายขนมเปือกปุ่นเล็ก ๆ

เรียงอย่างเป็นระเบียบ เพศเมียไม่มีโครงสร้างที่ทำให้เกิดเสียงจากปีกคู่หน้า จึงไม่สามารถทำเสียงร้องได้ และส่วนอกปล้องที่ 3 เป็นที่ตั้งของขาคู่หลังที่แข็งแรง มีโคนขาหลังใหญ่และยาวหนามแหลมคม และแข็งแรง ช่วยในการกระโดดของจิ้งหรีด ปีกคู่หลังตั้งอยู่ที่อกปล้องที่ 3 เช่นกัน ซึ่งเวลาหุบจะซ่อนอยู่ใต้ปีกคู่หน้า และยังมีแผ่นแข็งคล้ายรูปอานม้าคลุมด้านบนของอกปล้องแรก

2.2.2.3 ท้อง (Abdomen) จิ้งหรีดตัวเต็มวัย มีปล้องท้อง 11 ปล้อง โดยปล้องที่ 11 มีขนาดเล็ก มองเห็นยากและซ่อนอยู่กับปล้องที่ 10 ส่วนปลายสุดของปล้องท้องมีแพนหาง 1 คู่ระหว่างแพนหาง (Cercus) ของจิ้งหรีดตัวเมียมีอวัยวะวางไข่ (Ovipositor) ยื่นยาวออกไป ซึ่งมีลักษณะคล้ายเข็มมองเห็น ชัดเจน ซึ่งการมีอวัยวะวางไข่นี้ใช้บ่งบอกว่าเป็นจิ้งหรีดเพศเมียได้เป็นอย่างดี ด้านข้างของปล้องท้องทั้งสองข้างมีรูหายใจปล้องละหนึ่งคู่

### 2.2.3 พันธุ์จิ้งหรีดที่พบในไทย

ชนิดจิ้งหรีด จิ้งหรีดที่พบในประเทศไทย ซึ่งเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย มี 4 ชนิด ดังนี้

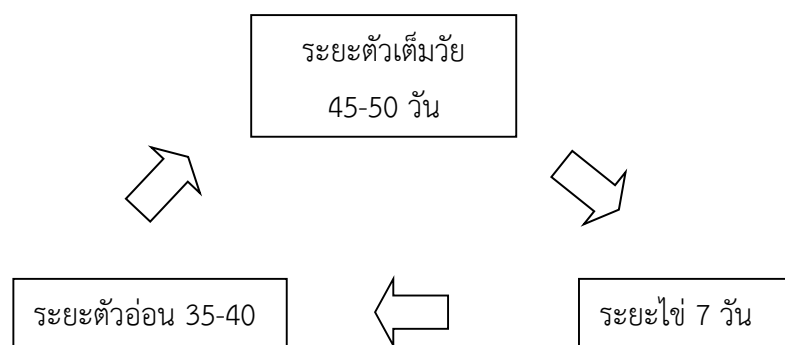
2.2.3.1 จิ้งโกร่ง (*Brachtrupes portentosa* Lichtenstein) บางพื้นที่เรียก จิโปม จิ้งกู่ จินาย เป็นต้น จิ้งหรีดชนิดนี้เป็นจิ้งหรีดขนาดใหญ่ ประกอบด้วยส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ลำตัวทุกส่วนมีสีน้ำตาล ยกเว้นขาคู่หลังส่วนบนมีสีเหลือง และส่วนท้องมีสีครีม เมื่อโตเต็มวัยลำตัวจะกว้างประมาณ 1 ซม. ยาวประมาณ 3.5-4.0 ซม. มีหนวดยาว ชอบขุดรูตามดินร่วนปนทราย ภายในรูที่มีความลึก 5-10 ซม. มีรูแยก 1 รู เพื่อหลบภัยบริเวณ รอยแยกของ รูที่เป็นโพรงใหญ่สำหรับเก็บอาหาร รูลึกยาวประมาณ 30-50 ซม. ลึกประมาณ 20-30 ซม. กลางวันจะปิดปากรู และอาศัยอยู่ภายใน กลางคืนออกหากิน และส่งเสียงร้องดัง

2.2.3.2 จิ้งหรีดทองดำ (*Gryllus bimaculatus* Degeer) เป็นจิ้งหรีดขนาดกลาง บางพื้นที่เรียก จิโหล่น ประกอบด้วยส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ลำตัว และปีกมีสีดำหรือน้ำตาลปนดำ ทั้งตัว โตเต็มวัยจะมีลำตัวกว้างประมาณ 0.6 - 0.7 ซม. ยาวประมาณ 2.8 - 3.0 ซม. มีหนวดยาว ตัวผู้ส่วนหัวและอกมีสีดำ ปีกคู่หน้ายื่น ปีกมีสีน้ำตาลออกเหลืองเล็กน้อย โดยเฉพาะโคนปีกที่มีสีเหลืองแกม ส่วนตัวเมียส่วนหัว และอกมีสีดำปีกคู่หน้าเรียบ ปีกมีสีดำสนิท โคนปีกมีแต้มสีเหลือง 2 จุด ปลายปีกคู่หลังทั้งตัวผู้ตัวเมียยื่นยาวมากกว่าลำตัว ปลายท้องมีแพนหางยาว 1 คู่ ชอบอาศัยตามกองไม้ กองใบไม้ ร่องดิน ออกหากินในเวลากลางคืนและไม่ขุดรูอาศัย

2.2.3.3 จิ้งหรีดทองแดง (*Teleogryllus testaceus* Walker) บางพื้นที่เรียก จิ้งหรีดนิล หรือ จินาย หรือ จิ้งหรีดพม่า เป็นจิ้งหรีดขนาดกลาง ประกอบด้วยส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง โตเต็มวัยลำตัวกว้างประมาณ 0.5-0.6 ซม. ยาวประมาณ 2.5-2.80 ซม. ลำตัวทุกส่วนมีสีน้ำตาลเข้ม บริเวณหัวเหนือขอบตามีแถบสีน้ำตาลเข้มรูปตัว V ตัวผู้มีสีลำตัวทุกส่วนเข้มกว่าตัวเมีย ด้านล่างท้องมีสีครีม เคลื่อนที่ได้ว่องไว ชอบอาศัยตามกองไม้ กองใบไม้ ร่องดิน ออกหากินในเวลากลางคืน และไม่ขุดรูอาศัย

2.2.3.4 จิ้งหรีดทองลาย (*Modicogryllus confirmata* Walker) จิ้งหรีดทองลายหรือนิยมเรียกว่า แมงสะตึง ตัวผู้และตัวเมียมีอายุเต็มวัย 38-60 วัน เป็นจิ้งหรีดขนาดกลาง ประกอบด้วยส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ลำตัวทุกส่วนมีสีเหลืองแกมน้ำตาล มีลักษณะสีเป็นลาย ลำตัวกว้างประมาณ 0.4-0.55 ซม. ยาวประมาณ 2.0-2.5 ซม. ตัวเมียลำตัวมีสีน้ำตาลปนเหลือง ปีกคู่หน้าเรียบมีสีน้ำตาลเป็นลายเส้นชัดเจน ปีกคลุมปลายท้องไม่มีด มีอวัยวะวางไข่คล้ายเข็มสีน้ำตาล ยาวประมาณ 1.2 เมตร ยาวกว่าแขนงเล็กน้อย ตัวผู้มีสีลำตัวเข้มกว่าตัวเมีย และมีลายแต้มที่หัว ปีกคู่หน้ายื่นปลายท้องมีแขนง จิ้งหรีดชนิดนี้ ชอบอาศัยตามกองไม้ กองใบไม้ ร่องดิน ออกหากินในเวลากลางคืน และไม่ขุดรูอาศัย

#### 2.2.4 วงจรชีวิตของจิ้งหรีด



ภาพที่ 2.11 วงจรชีวิตของจิ้งหรีด

#### 2.2.5 การเพาะเลี้ยงจิ้งหรีดทองคำ

จิ้งหรีดสายพันธุ์ทองดำ (Common black cricket, Family Gryllidae, Order Orthoptera, ชื่อวิทยาศาสตร์ *Acheta bimaculatus* De Geer, *Grallus bimaculatus* De Geer) มีลำตัวสีดำ ตัวยาวประมาณ 3 ซม. กว้าง 0.9 ซม. จิ้งหรีดตัวผู้ตัวโตเต็มวัยปีกบนจะมีลายหยักย่นที่สามารถใช้ในการส่งเสียงร้องโดยใช้ปีกถูสีกัน ตัวเมียปีกลายตรงเรียบมีอวัยวะวางไข่ยาว 1.5 ซม. ระยะไข่จิ้งหรีด 7 วัน ระยะตัวอ่อนประมาณ 11/2-2 เดือน อายุตัวเต็มวัยประมาณ 15 วัน อาหารเลี้ยงจิ้งหรีด ได้แก่ อาหารผักสด หญ้าขน ผักปราบ สับปะรด และ อาหารไก่เน่านำการเลี้ยงโดยใช้ตัวผู้ 1 ตัว ตัวเมีย 2 ตัว ให้ผสมพันธุ์ในโหลแก้ว หลังจากนั้นสองอาทิตย์ จึงย้ายตัวอ่อนลงบ่อเลี้ยงซีเมนต์ ใช้ดินร่วนปนทรายรองก้นบ่อสูงประมาณ 2-3 ซม. เพื่อให้รักษาความชื้นภายในรังไม่ให้มากหรือน้อยเกินไป พ่นน้ำทุก 3 วัน ห้ามตั้งกลางแดด ควรเลี้ยงในพื้นที่โล่งมีอากาศถ่ายเทได้ดี การป้องกันโรคโดยใช้ซอล์กชูรอบก้นบ่อเลี้ยง และเมื่อเลี้ยงได้ 1-2 ชุด ให้เปลี่ยนดินใหม่เพื่อป้องกันไร (ทัศนีย์ และคณะ, 2534)

### 2.2.6 สารอาหารที่พบในจิ้งหรีด

จิ้งหรีดจัดเป็นสมุนไพรประเภทสัตว์วัตถุ จิ้งหรีดเป็นแมลงที่ผู้คนนิยมนำมาบริโภคอย่างแพร่หลาย และจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จิ้งหรีดมาใช้เป็นยาเพื่อรักษาอาการไข้และโรคความดันโลหิตสูงและในปัจจุบันนี้จิ้งหรีดถือว่าเป็นยา (Cui et al., 2002) ในจิ้งหรีดมีสารอาหารต่าง ๆ มากมายเช่น โปรตีน (52.8%), ไขมัน (21.8%), เกล็ด (4.6%) และความชื้น (11.9%) และมีแร่ธาตุ P (0.8%), K (0.9%), Na (0.4%), Mg (0.1%), Ca (0.3%), SiO<sub>2</sub> (0.4%), Fe (239 ppm), Mn (40 ppm), Zn (433 ppm), Cu (31 ppm) และ Cr (1.8 ppm) ซึ่งส่วนประกอบทางเภสัชวิทยาที่สำคัญของจิ้งหรีดถูกระบุว่าเป็นกรดไขมัน: oleic (36.48%) linoleic (13.6%) และ  $\gamma$ -linoleic (1.8%) (Ahn et al., 2000) และยังมีรายงานว่าในไขมันของจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำมีสาร Choline phosphoglyceride (54.2%) and ethanolamine phosphoglyceride (35.4%) linoleic Acid จัดอยู่กลุ่มโอเมก้า 6 (Linoleic Acid) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม และมีพันธะคู่ 2 คู่ พันธะคู่อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 12 มีชื่อเคมีว่า 9, 12 octadecadienoic acid จัดเป็น polyunsaturated fatty มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดโรคหัวใจ โดยการลดการแข็งตัวของเลือดด้วย ซึ่งการลดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดทำให้ หลอดเลือดที่หัวใจเป็นปกติ ลดอัตราการเกิดภาวะโรคความดันโลหิตสูง ลดการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง และยังป้องกันโรคสมองเสื่อม หรือโรคอัลไซเมอร์ได้ โดยลดการแข็งตัวบริเวณเยื่อหุ้มของเม็ดเลือดแดงจึงทำให้สมองได้รับออกซิเจนมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า EPA และ DHA มีหน้าที่ในการควบคุมการเกิดการอักเสบผ่านการผลิตสารที่เรียกว่า eicosanoids (Oliver et al., 2010) ( $\gamma$ -gamma) – linolenic acid; 18 : 3  $\omega$  6) เป็นกรดไขมันที่มีประโยชน์ในทางเภสัชกรรม คือ จะช่วยลดปัญหาเรื่องโคเลสเตอรอลลด (low density lipoprotein) ลดอาการปวดประจำเดือน (Pre – menstrual syndrome) และลดผื่นแพ้จากกรรมพันธุ์ (Atopic dermatitis / Eczema) GLA พบมากในพืชโดยเฉพาะ evening primrose และในราบางชนิด (Cohen et al., 1993 ) Oleic acid เป็นกรดไขมันที่มีสูตรเคมีคือ C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> อยู่ในกลุ่มไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวโอเมก้า 9 เป็นไขมันที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ได้มาจากน้ำมันมะกอก (olive oil) ซึ่งมีปริมาณกรดโอเลอิกสูง นอกจากนี้ยังพบในน้ำมันพีแคนคาโนล่าน้ำมันถั่วลิสง น้ำมันแมคเดเมียและน้ำมันดอกทานตะวัน นอกจากนี้ยังพบในไขมันไก่ และกรดโอเลอิกเป็นกรดไขมันที่พบมากที่สุดเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ (Kokatnur, MG et al., 1979) ซึ่งจะไม่เพิ่มระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินอี ซึ่งเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ช่วยลดการเกิดมะเร็ง และช่วยลดการทำลายหลอดเลือด ช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคเส้นเลือดหัวใจอุดตัน

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาเปรียบเทียบถึงปริมาณสารอาหารต่างๆที่พบในจิ้งหรีด และในแมลงกินได้อื่น ๆ ดังตารางที่ 2.1 – 2.4

ตารางที่ 2.1 พลังงานและองค์ประกอบหลักของแมลงที่กินได้ ในน้ำหนักสด 100 กรัม

| แมลง           | พลังงาน<br>(กิโลแคลอรี) | ความชื้น<br>(กรัม) | โปรตีน<br>(กรัม) | ไขมัน<br>(กรัม) | คาร์โบไฮเดรต<br>(กรัม) |
|----------------|-------------------------|--------------------|------------------|-----------------|------------------------|
| จิ้งโกร่ง      | 188                     | 67                 | 17.5             | 12.0            | 2.4                    |
| จิ้งหรีด       | 133                     | 73                 | 18.6             | 6.0             | 1.0                    |
| ดักแด้ไหม      | 152                     | 70                 | 14.7             | 8.3             | 4.7                    |
| ด้กแตนปาทั้งกำ | 157                     | 66                 | 27.6             | 4.7             | 1.2                    |
| ตัวอ่อนของต่อ  | 140                     | 73                 | 14.8             | 6.8             | 4.8                    |
| แมลงกินุน      | 98                      | 76                 | 18.1             | 1.8             | 2.2                    |
| แมลงป่อง       | 130                     | 69                 | 24.5             | 2.3             | 2.8                    |
| หนอนไม้ไผ่     | 231                     | 67                 | 9.2              | 20.4            | 2.5                    |

ที่มา: ดัดแปลงจาก Data collected from *The Food Insects Newsletter* (1996)

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นในแมลงที่กินได้ (มิลลิกรัม / กรัม โปรตีน)

| แมลง               | Isoleucine | Leucine | lysine | Methionine+ Cystine | Phenylalanine + Tyrosine | Threonine | Tryptophan | Valine | Amino Acid Score |
|--------------------|------------|---------|--------|---------------------|--------------------------|-----------|------------|--------|------------------|
| จิ้งหรีด           | 29.82      | 60.89   | 46.11  | 30.89               | 62.40                    | 28.99     | 24.41      | 34.37  | 68.7             |
| ดักแด้ไหม          | 46.09      | 70.59   | 77.24  | 36.28               | 121.98                   | 45.31     | 18.97      | 52.15  | 100              |
| ดักแด้หนอนปาทังก้า | 32.72      | 59.45   | 35.71  | 20.92               | 59.97                    | 22.30     | 17.33      | 35.59  | 55.8             |
| ตัวอ่อนของต่อ      | 42.58      | 78.53   | 58.96  | 20.80               | 165.03                   | 45.28     | 10.12      | 53.68  | 59.4             |
| แมลงกิ้งก่า        | 32.06      | 51.84   | 18.81  | 44.56               | 49.28                    | 26.91     | 27.13      | 29.33  | 34.2             |
| แมลงป่อง           | 21.07      | 50.04   | 31.31  | 24.58               | 76.48                    | 19.36     | 22.33      | 24.42  | 48.4             |
| หนอนไม้ไผ่         | 33.89      | 60.02   | 55.97  | 41.75               | 100.72                   | 34.89     | 41.11      | 38.76  | 77.5             |

ที่มา: ดัดแปลงจาก นันทยา จงใจเทศ (2549)

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบของกรดอะมิโนไม่จำเป็นในแมลงที่กินได้ มิลลิกรัม/กรัม  
โปรตีน

| แมลง              | Arginin | Histidin | Alanine | Aspartic | Glutamic Acid | Glycine | Proline | Serine |
|-------------------|---------|----------|---------|----------|---------------|---------|---------|--------|
| จิ้งหรีด          | 45.33   | 15.44    | 78.05   | 69.19    | 96.80         | 47.19   | 45.15   | 35.86  |
| ดักแด้ไหม         | 58.78   | 35.35    | 39.41   | 88.88    | 107.33        | 29.66   | 44.38   | 37.68  |
| ตั๊กแตนป่าทั้งก้า | 36.02   | 13.53    | 92.71   | 48.79    | 76.36         | 48.85   | 48.71   | 23.88  |
| ตัวอ่อนของต่อ     | 41.04   | 35.28    | 43.50   | 79.63    | 180.61        | 48.16   | 56.75   | 3.80   |
| แมลงกิ้งกูน       | 32.31   | 16.10    | 58.28   | 61.16    | 97.55         | 52.75   | 46.96   | 31.34  |
| แมลงป่อง          | 41.25   | 18.83    | 50.11   | 52.00    | 67.65         | 70.83   | 26.23   | 25.84  |
| หนอนไหมไข่        | 47.87   | 23.26    | 37.70   | 88.16    | 93.15         | 32.72   | 40.70   | 41.34  |

ตารางที่ 2.4 ปริมาณคอเลสเตอรอลและกรดไขมันของแมลงที่กินได้ในน้ำหนักส่วนที่  
รับประทานได้ 100 กรัม ‘

| แมลง             | Cholesterol | Fat  | Unsaturated    | Monounsaturated fatty acid | Polyunsaturated fatty acid |
|------------------|-------------|------|----------------|----------------------------|----------------------------|
|                  | (mg)        | (g)  | (% fatty acid) |                            |                            |
| จิ้งโกร่ง        | ND          | 12.0 | 35.02          | 32.34                      | 29.56                      |
| จิ้งหรีด         | 105         | 6.0  | 36.45          | 30.12                      | 31.14                      |
| ดักแด้ไหม        | ND          | 8.3  | 70.36          | 19.81                      | 9.35                       |
| ด้วงเต็นปาทังก้า | 66          | 4.7  | 31.06          | 28.75                      | 39.32                      |
| ตัวอ่อนของต่อ    | ND          | 6.8  | 4.58           | 40.39                      | 12.64                      |
| แมลงกินูน        | 56          | 1.8  | 33.33          | 30.02                      | 32.36                      |
| แมลงป่อง         | 97          | 2.3  | 28.99          | 43.30                      | 20.98                      |
| หนอนไม้ไผ่       | 34          | 20.4 | 48.71          | 46.86                      | 2.86                       |

ND = Not Detected

## 2.2.7 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

### 2.2.7.1 ฤทธิ์การต้าน oxidation

จากการให้สารสกัดจากจิ้งหรีดด้วย ethanol ในหนู Wistar rats เป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีผลลดการบวม (anti-edema) โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ creatinine phosphokinase และมีผลยับยั้งการเกิด oxidation ในระดับ DNA โดยมีผลลดระดับ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHdG) และจากการศึกษา gene expression profile ด้วยวิธี DNA microarray พบว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน reticulon 4 (Rtn 4) ซึ่งเป็น gene ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน (Mi Young Ahn et.al., 2015) นอกจากนั้นยังพบว่า ผงจิ้งหรีดยังสามารถกระตุ้น

การทำงานของ antioxidant enzyme ได้แก่ catalases (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (Taufek et al., 2016)

#### 2.2.7.2 ฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

จากการศึกษาผลของสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย hexane, butanol, และน้ำ พบว่าสารสกัดจิ้งหรีดทั้ง 3 fraction มีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการเพิ่มระดับ IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ใน spleen cells จากหนู BALB/c mouse โดยพบว่าสารสกัดจากน้ำมีฤทธิ์ดีที่สุดในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (SEO Dong-Hwan et al., 2004)

#### 2.2.7.3 ฤทธิ์ในการลดไขมันและโคเรสเตอรอลในตับ

ผลของสารสกัดจิ้งหรีดต่อกระบวนการ metabolism ของไขมัน ได้ถูกทดสอบในหนูสายพันธุ์ Sprague-Dawley rats หลังจากให้สารสกัดจิ้งหรีดแก่หนู เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถลดระดับ total lipid และ total cholesterol ในตับ (HWANG et. al., 2004)

#### 2.2.7.4 ฤทธิ์ในการกำจัดสารพิษ

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า จิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำหรือ ethanol มีฤทธิ์ในการขับสารพิษออกจากตับโดยการเพิ่มขึ้นของ alcohol dehydrogenase (ADH) และ acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) ( Lee , 2004) ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นเมื่อแอลกอฮอล์ชนิดเอทานอล (ethanol) ที่รับประทานเข้าไปจะถูกทำลายที่ตับโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase, ADH) เกิดเป็นอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และเปลี่ยนแปลงเปลี่ยนกรดแอซิติก (acetic acid) โดยเอนไซม์แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase, ALDH) ซึ่งจะถือว่าเป็นกลไกการกำจัดสารพิษของร่างกาย (detoxification) (Lieber ,2003: Lieber , 1991)

### 2.2.8 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจิ้งหรีด

จากการศึกษาความเป็นพิษของจิ้งหรีดที่สกัดด้วย ethanol ในหนูสายพันธุ์ Sprague-Dawley rat พบว่าหลังจากให้สารสกัดจากจิ้งหรีดขนาด 250, 500 และ 1000 mg/kg/day เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไม่พบความเป็นพิษของสารสกัดจากจิ้งหรีดด้วย ethanol (Somin Lee et.al., 2016)

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การเตรียมสารสกัดจิ้งหรีด

##### 3.1.1 สารเคมีที่ใช้

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| เอทานอล (ethanol)               | Emsure  |
| Phosphate-buffered saline (PBS) | Amresco |

##### 3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

|                                                |                       |
|------------------------------------------------|-----------------------|
| กระดาษกรอง (filter paper)                      | 1000-125/Whatman      |
| ขวดก้นกลม (round bottom flask)                 | CG 2504/Pyrex         |
| เครื่องช่วยทำให้ระเหยแห้ง (evaporator)         | Buchi                 |
| ชุดกรองสุญญากาศ (vacuum filter set)            | SUS316/Rocker         |
| เครื่อง 4 ตำแหน่ง (digital balance ; Digits)   | XP 205/Mettler toledo |
| ตู้อบลมร้อน (hot air oven)                     | FED115/Binder         |
| ชุดทำให้ระเหยแห้งด้วยระบบความเย็น (freeze-dry) | Christ                |

##### 3.1.3 การเลือก solvent ในการสกัดจิ้งหรีด

จิ้งหรีดเป็นแมลงที่มีองค์ประกอบที่หลากหลาย เช่น โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุต่างๆ ดังนั้นจึงต้องทำการเลือก solvent ที่นำมาสกัดจิ้งหรีดเพื่อให้สารสำคัญต่างๆที่อยู่ภายในจิ้งหรีด ออกมา กับ solvent นั้น ๆ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเลือก solvent ที่จะนำมาสกัดจิ้งหรีดมา 3 ชนิด คือ เอทานอล (EtOH) น้ำ DI (Deionized water) และ Phosphate-buffered saline (PBS)

การสกัดจิ้งหรีดด้วยเอทานอล เพื่อต้องการให้โปรตีน ไขมันที่ fatty acid ที่ไม่มีขั้วออกมา กับตัวทำละลายเอทานอล

การสกัดจิ้งหรีดด้วยน้ำเพื่อเลียนแบบการใช้ในแบบพื้นบ้าน ที่ก่อนจะนำจิ้งหรีดมารับประทานต้องทำการลวกจิ้งหรีดก่อนจึงนำมาปรุงเป็นอาหาร

การสกัดจิ้งหรีดด้วย Phosphate-buffered saline (PBS) เพื่อป้องกันการทำลาย องค์ประกอบภายในของจิ้งหรีด

### 3.1.4 ขั้นตอนในการทำการทดลอง

การเตรียมจิ้งหรีดมีขั้นตอนดังนี้ นำจิ้งหรีดไปล้างทำความสะอาดแล้วทำการอบจิ้งหรีดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำจิ้งหรีดมาบด และนำไปเติมตัวทำละลายต่าง ๆ

การเตรียมสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอลมีวิธีการ ดังนี้ นำจิ้งหรีดที่บดแล้วไปหมักกับเอทานอล 95% เป็นเวลา 7 วัน แล้วกรองกระดาษกรอง จากนั้นทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator แล้วทำการเก็บสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชชีวภาพที่มีผลต่อโรคอัลไซเมอร์

การเตรียมสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ DI และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ (PBS) มีขั้นตอนดังนี้ นำจิ้งหรีดที่บดแล้วมาต้มด้วย DI และ PBS เป็นเวลา 20 นาที แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง นำไป centrifuge ที่ 25 องศาเซลเซียส 3,500 รอบ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเข้าเครื่อง freeze-dry 3 วัน นำจิ้งหรีดที่สกัดด้วย DI water และ PBS ไปเก็บไปที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีผลต่อโรคอัลไซเมอร์

## 3.2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl Radicals)

### 3.2.1 สารเคมีที่ใช้

|                                                     |                |
|-----------------------------------------------------|----------------|
| DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals; DPPH) | Sigma-Aldrich  |
| โทรลล็อกซ์ (trolox)                                 | Sigma- Aadrich |
| เอทานอล (ethanol)                                   | Emsure         |

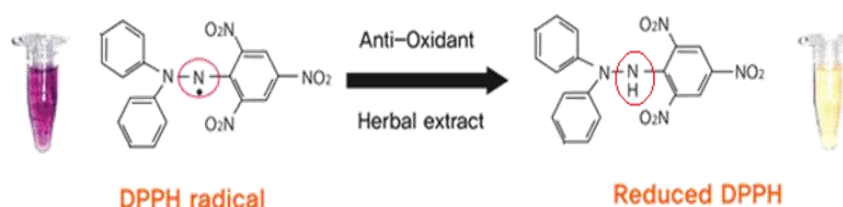
### 3.2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

|                                                  |                          |
|--------------------------------------------------|--------------------------|
| เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)                   | G 560E บริษัทสยามแอนโต   |
| เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (vigital balance ; Digits) | XP 205/Mettler toledo    |
| ไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader)            | M 965+/Accu Reader+      |
| ไมโครปิเปต (micropipettes)                       | F2GLP/Thermo Scientific™ |

### 3.2.3 หลักการ

ในการทดลองนี้จะใช้อนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-pricryl hydrazyl; DPPH•) เป็นสารตั้งต้น เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระ DPPH มีอิเล็กตรอนเดี่ยว มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวสูง และสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ

จะรับไฮโดรเจนไอออน ( $H^+$ ) จากสารต้านอนุมูลอิสระกลายเป็น DPPH (ภาพที่ 12) ซึ่งความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารจะถูกประเมินโดยวัดความสามารถในการลดปริมาณอนุมูลอิสระ DPPH (MacDonald-Wicks et al., 2009)



ภาพที่ 3.1 การปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระ DPPH

ที่มา: Teixeira J et al. (2013)

### 3.2.4 วิธีการทดลอง

วิธีนี้ทำโดยดัดแปลงวิธีของ Leung และคณะปี ค.ศ.2006 โดยการทำละลายสารสกัดจากจิ้งหรีดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำการละลาย DPPH 200 ไมโครโมลาร์ ในเอทานอล 20 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากจิ้งหรีด 100  $\mu$ l ลงใน 96 well plate แล้วบ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใช้โทรล็อกซ์ (trolox) เป็นสารมาตรฐานซึ่ง จะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลืออยู่ 50% คำนวณค่า %inhibition ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[(\text{Absorbance}_{\text{สารทดสอบ}} - \sum \text{Absorbance}_{\text{DPPH}})]}{(\sum \text{Absorbance}_{\text{ควบคุม}} - \sum \text{Absorbance}_{\text{DPPH}})} \times 100$$

รายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) (Moon, J et al., 2009)

### 3.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay (2,2 azino-bisethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

#### 3.3.1 สารเคมีที่ใช้

|                                                                                    |                |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| ABTS (2,2 azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)diammonium salt; ABTS) | Sigma- Aadrich |
| โทรลล๊อกซ์ (trolox)                                                                | Sigma- Aadrich |
| เอทานอล (ethanol)                                                                  | Emsure         |

#### 3.3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

|                                                  |                          |
|--------------------------------------------------|--------------------------|
| เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)                   | G 560E บริษัทสยามแอนโต   |
| เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (vigital balance ; Digits) | XP 205/Mettler toledo    |
| ไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader)            | M 965+/Accu Reader+      |
| ไมโครปิเปต (micropipettes)                       | F2GLP/Thermo Scientific™ |

#### 3.3.3 หลักการ

การทดสอบวิธีนี้เป็นวิธีวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางอ้อมโดยการเปลี่ยนสาร ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid ; ABTS) ให้อยู่ในรูปอนุมูลอิสระ  $ABTS^+$  โดยการทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ( $K_2S_2O_8$ ) โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตจะออกซิไดซ์ ABTS ให้กลายเป็นอนุมูลอิสระ  $ABTS^+$  ที่สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยอนุมูลอิสระ ABTS จะทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระโดยการรับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระแล้วกลายเป็น ABTS ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระถูกประเมินด้วยการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ (reduce) อนุมูลอิสระ ABTS (ภาพที่ 13) (Re, Roberta et al., 1999)

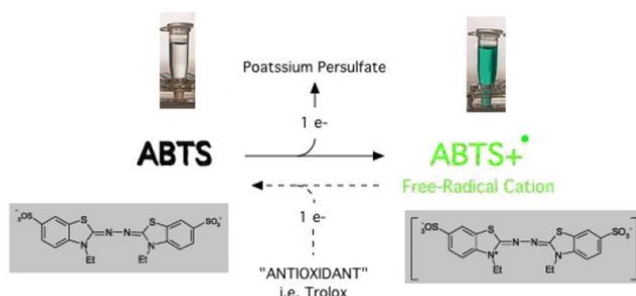


Figure 2: ABTS chemical reaction (adapted of Pannala et al. in 2011 [23]).

### ภาพที่ 3.2 การทำปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระ ABTS

ที่มา: Aline Augusti Boligon et al. (2014)

### 3.3.4 วิธีการทดลอง

การทดลองนี้ดัดแปลงจาก Arnao และคณะปี ค.ศ.2001 ทำโดยละลาย ABTS 0.0036 กรัม และโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.00067 กรัม ในน้ำ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องหลังจากนั้นเจือจางสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS ที่ได้ด้วยเอทานอลแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จนได้ค่าดูดกลืนแสงเป็น  $0.7 \pm 0.02$  หลังจากนั้นผสมสารสกัดจากจิ้งหรีดที่ละลายในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และอนุมูลอิสระ ABTS 100 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ใช้โทรลล็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้ง (% inhibition)

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[(\text{Absorbance}_{\text{สารตัวอย่าง}} - \Sigma \text{Absorbance}_{\text{ABTS}})]}{(\Sigma \text{Absorbance}_{\text{ควบคุม}} - \Sigma \text{Absorbance}_{\text{ABTS}})} \times 100$$

รายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลเอปทีเอชได้ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) (Arnao et al., 2001)

## 3.4 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholinesterase ด้วยวิธี modified Ellman's Spectrophotometric method

### 3.4.1 สารเคมีที่ใช้

|                                                     |               |
|-----------------------------------------------------|---------------|
| ดีทีเอ็นบี (5-5'-thiobis-2-nitrobenzoic acid; DTNB) | Sigma-Aldrich |
| Acetylthiocholine iodide (ATCI)                     | Sigma-Aldrich |
| ทาครีน (Tacrine)                                    | Sigma-Aldrich |
| Enzyme acetylcholinesterase                         | Sigma-Aldrich |
| เอทานอล (Ethanol)                                   | Emsure        |

### 3.4.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

|                                                  |                          |
|--------------------------------------------------|--------------------------|
| เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)                   | G 560E บริษัทสยามแอนโต   |
| เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (vigital balance ; Digits) | XP 205/Mettler toledo    |
| ไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader)            | M 965+/Accu Reader+      |
| ไมโครปิเปต (micropipettes)                       | F2GLP/Thermo Scientific™ |

### 3.4.3 หลักการ

ทดสอบดูความสามารถของสารสกัดจากจิ้งหรีด ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase โดยวิธี modified Ellman's spectrophotometric โดยวัดจากปริมาณ 5-thio-2-nitrobenzoate ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของแอซิติลโคลีนไอโอไดด์ acetylthiocholine iodide (ATCI) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น โดยมีเอนไซม์ acetylcholinesterase เข้าทำปฏิกิริยาเกิดเป็นอะซิเตท (acetate) และ ไธโอโคลีน (thiocholine) ซึ่งไม่สามารถดูดกลืนแสงได้ จึงมีการเติมสารละลายดีทีเอ็นบี (5-5'-thiobis-2-nitrobenzoic acid; DTNB) เข้าไปเพื่อจับกับไธโอโคลีนเกิดเป็น 5-thio-2-nitrobenzoate ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

### 3.4.4 วิธีการทดลอง

นำสารแอซิติลโคลีนไอโอไดด์ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นสารตั้งต้น ในการเกิดปฏิกิริยา และสารดีทีเอ็นบี(5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid ;DTNB) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ลง 96 ไมโครเวลเพลท จากนั้นเติมแต่ละหลุมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์หรือสารทดสอบที่ความเข้มข้น ต่างๆ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร สุดท้ายเติมเอนไซม์ acetylcholinesterase ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาทีเป็นเวลา 5 นาที ใช้ tacrine เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) (Ellman et al., 1996)

## 3.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเกิด amyloid aggregation ด้วยวิธี

### thioflavin T assay

#### 3.5.1 สารเคมีที่ใช้

|                                              |                    |
|----------------------------------------------|--------------------|
| ไธโอฟลาวิน ที (thioflavin T)                 | Sigma-Aldrich      |
| ไกลซีน (glycine)                             | Amresco            |
| เบต้าอะมัยลอยด์ 42 (amyloid beta peptide 42) | Abcam              |
| ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide)       | Fisher chemical 58 |
| เคอร์คูมิน (curcumin)                        | MPBiomedical       |

#### 3.5.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

|                                                 |                          |
|-------------------------------------------------|--------------------------|
| เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)                  | G 560E บริษัทสยามแอนโต   |
| เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (vigtal balance ; Digits) | XP 205/Mettler toledo    |
| ไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader)           | M 965+/Accu Reader+      |
| ไมโครปิเปต (micropipettes)                      | F2GLP/Thermo Scientific™ |

### 3.5.3 หลักการ

ทดสอบความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์โดยวิธีไธโอฟลาวิน ที (thioflavin T assay) การทดสอบนี้เป็นการหาโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ที่เกาะกลุ่มกัน โดยเมื่อไธโอฟลาวิน ที อยู่ในสถานะที่เป็นเบส จะอยู่ในรูปประจุบวก สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ที่เกาะกลุ่มกัน การจับกันของไธโอฟลาวิน ที กับเบต้าอะมัยลอยด์นั้นเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดย fluorescence intensity ที่เปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเบต้าอะมัยลอยด์ที่เข้าทำปฏิกิริยากับไธโอฟลาวิน ที (Le Vine., 1993)

### 3.5.4 วิธีการทดลอง

เพื่อทดสอบความสามารถของสารทดสอบในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของ beta amyloid ด้วยวิธี thioflavin T (ThT) fluorescence assay โดยมีขั้นตอนดังนี้เติม beta amyloid ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ สารสกัดจากจิ้งหรีดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากนั้นทำการวิเคราะห์การเกาะกลุ่มของ beta amyloid โดยการเติม 5 ไมโครโมลาร์ ของสารละลาย thioflavin T ปริมาตร 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงซึ่งกระตุ้นและวัดการปลดปล่อยคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 446 และ 490 นาโนเมตร ตามลำดับ แล้วนำค่า fluorescence intensity ที่ได้มาคำนวณ % aggregation และ % inhibition ใช้ เคอร์คูมิน (curcumin) เป็นสารมาตรฐาน

## 3.6 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อเซลล์ประสาท SH-SY5Y โดยวิธี MTT assay

### 3.6.1 สารเคมี

อาหารเลี้ยงเซลล์

Dulbecco's Modified Eagle Medium:

Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) Sigma-Aldrich

ฟิตัลโบวีนซีรัม (fetal Bovine Serum) Gibco

โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodium hydrogen carbonate) Unilab

โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) Univar

โพแทสเซียม คลอไรด์ (potassium chloride) Rankem

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) Fisher chemical

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5

-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Molecular probes

เพนิซิลลินสเตรปโตมัยซิน (penicillin streptomycin) Gibco

### 3.6.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

|                                                |                          |
|------------------------------------------------|--------------------------|
| เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)                 | G 560E บริษัทสยามแอนโต   |
| เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (vital balance ; Digits) | XP 205/Mettler toledo    |
| ไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader)          | M 965+/Accu Reader+      |
| ไมโครปิเปต (micropipettes)                     | F2GLP/Thermo Scientific™ |

### 3.6.3 หลักการ

ทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT reduction assay คือการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยวัดจาก mitochondrial succinic dehydrogenase activity ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมี mitochondrial function ในเซลล์ Krebs cycle ที่เกิดใน mitochondria เป็น metabolic pathway ที่สำคัญในการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยขั้นตอนต้น คือ การเปลี่ยนจาก succinate ไปเป็น fumarate โดย succinic dehydrogenase (SDH) ส่วน FAD เป็นตัวที่ทำให้ปฏิกิริยา reduction สมบูรณ์โดยผ่าน  $FADH^2$  และ  $FADH^{2+}$  สามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ไปเป็น formazan ที่มีสีน้ำเงินและตกตะกอนใน mitochondria โดยการทดสอบนี้ต้องการ disodium succinate เป็นตัวตั้งต้นเมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์มีผลทำให้มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำเงินผลึกของ MTT formazan จะถูกละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ก่อนที่จะนำไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

### 3.6.4 วิธีการทดลอง

วิธีการเพาะเลี้ยง human neuroblastoma cell (SH-SY5Y) ในอาหารเลี้ยงเซลล์คือ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ใน flask ขนาด 75 ml ในตู้บอดูอุณหภูมิ 37 °C หล่อเลี้ยงด้วย 5% CO<sub>2</sub> อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุก 2-3 วัน เซลล์จะถูกทดสอบโดยนำมาเลี้ยงในภาชนะเลี้ยง 96 well plate 3 วัน

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อเซลล์ประสาท โดยนำสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1-100 µg/ml) มาบ่มกับเซลล์ประสาทใน 96 well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย 0.5 mg/ml MTT ลงในเซลล์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารตัวทำละลาย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm คำนวณ % cell viability

$$\% \text{cell viability} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{สารทดสอบ}}}{\text{Absorbance}_{\text{สารควบคุม}}} \times 100$$

### 3.7 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากจิ้งหรีดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทการเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์โดยวิธี WST-8 assay

#### 3.7.1 สารเคมี

อาหารเลี้ยงเซลล์

Dulbecco's Modified Eagle Medium:

Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) Sigma-Aldrich

ฟิตัลโบวีนซีรัม (fetal Bovine Serum) Gibco

โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต

(sodium hydrogen carbonate) Unilab

โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) Univar

โพแทสเซียม คลอไรด์ (potassium chloride) Rankem

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) Fisher chemical

Cell Counting Kit-8 Dojindo

เพนิซิลลินสเตรปโตมัยซิน (penicillin streptomycin) Gibco

N-acetylcysteine Sigma-Aldrich

#### 3.7.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) G 560E บริษัทสยามแอนโต

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (vigital balance ; Digits) XP 205/Mettler toledo

ไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) M 965+/Accu Reader+

ไมโครปิเปต (micropipettes) F2GLP/Thermo Scientific™

#### 3.7.3 หลักการ

ทดสอบโดยนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ด้านการทำลายเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์โดยวิธี WST-8 ทำการบ่มเบต้าอะไมลอยด์ก่อน ด้วยการนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เกิดการเกาะกลุ่มกัน หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงในเซลล์ที่ถูกเลี้ยงไว้ในสภาพเพาะเลี้ยง 96 ไมโครเวลเพลท เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเบต้าอะไมลอยด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบความสามารถในการป้องกันการทำลายเซลล์โดยคำนวณร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ด้วยวิธี WST8 (Itokazu et al., 2015)

$$\% \text{cell viability} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{สารทดสอบ}}}{\text{Absorbance}_{\text{สารควบคุม}}} \times 100$$

Absorbance สารควบคุม

### 3.8 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากจิ้งหรีดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องมาจาก hydrogen peroxide โดยวิธี MTT assay

#### 3.8.1 สารเคมี

อาหารเลี้ยงเซลล์

Dulbecco's Modified Eagle Medium:

|                                                                         |                  |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)                                        | Sigma-Aldrich    |
| ฟีตัลโบวีนซีรัม (fetal Bovine Serum)                                    | Gibco            |
| โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต<br>(sodium hydrogen carbonate)                 | Unilab           |
| โซเดียมคลอไรด์<br>(sodium chloride)                                     | Univar           |
| โพแทสเซียม คลอไรด์ (potassium chloride)                                 | Rankem           |
| ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide)                                  | Fisher chemical  |
| 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-<br>-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) | Molecular probes |
| เพนิซิลลินสเตรปโตมัยซิน<br>(penicillin streptomycin)                    | Gibco            |
| Cercumin                                                                | Sigma-Aldrich    |

#### 3.8.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

|                                                  |                          |
|--------------------------------------------------|--------------------------|
| เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)                   | G 560E บริษัทสยามแอนโต   |
| เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (vigital balance ; Digits) | XP 205/Mettler toledo    |
| ไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader)            | M 965+/Accu Reader+      |
| ไมโครปิเปต (micropipettes)                       | F2GLP/Thermo Scientific™ |

ทดสอบความสามารถในการป้องกันการทำลายเซลล์ โดยนำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3 ความเข้มข้น 1–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาบ่มกับเซลล์ประสาทใน 96 well plate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อจากนั้นเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย hydrogen Peroxide ( $H_2O_2$ ) บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร MTT ลงไปในเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารตัวทำลาย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

### 3.9 ศึกษาผลของสารสกัดต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen Peroxide โดยวิธี Western blotting analysis

#### 3.9.1 สารเคมีที่ใช้

|                                               |               |
|-----------------------------------------------|---------------|
| อะคริลาไมด์ (acrylamide)                      | Amresco       |
| โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) | Amresco       |
| ไดไธโอไธรีทอล (dithiothreitol)                | Gibgo         |
| แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium persulfate)        | Gibgo         |
| Blueye prestained protein ladder              | Gibgo         |
| ทวิน 20 (tween 20)                            | Gibgo         |
| แบรดฟอร์ด (bradford reagent)                  | Sigma-Aldrich |
| ไลซิส บัฟเฟอร์ (lisis buffer)                 | Gibgo         |
| N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)  | Gibgo         |

#### 3.9.2 วิธีทำการทดลอง

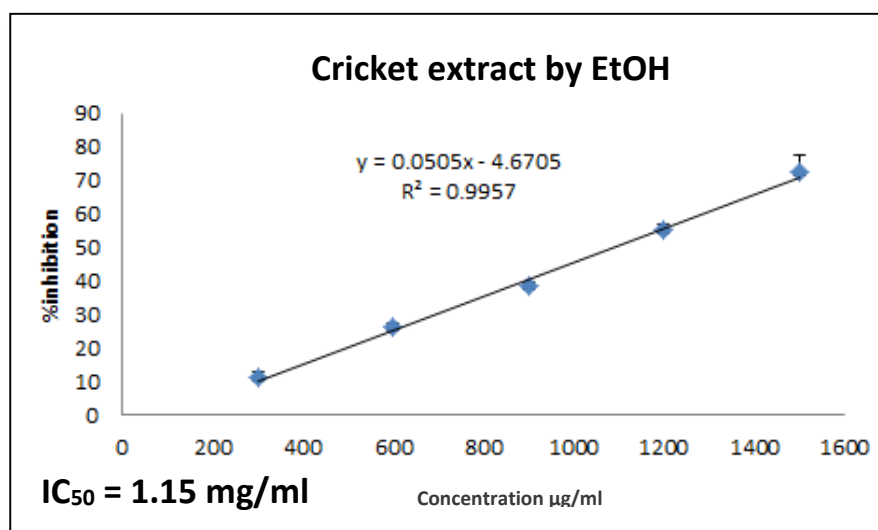
ดัดแปลงวิธีจาก (Liu et al., 2014) สำหรับวิธีการทดลองนำสารสกัดจากจิ้งหรีด ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาบ่มกับเซลล์ SH-SY5Y ใน 6-well plate เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร  $H_2O_2$  เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ โดยวิธี western blotting และ immunoblotting analysis โดยทำการแยกสกัดโปรตีน หลังจากนั้นจึง transfer โปรตีนจากเจลลงสู่แผ่น nitrocellulose membrane เพื่อนำมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีปฐมภูมิ (Primary antibody) ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่สนใจแล้วตรวจสอบการจับของแอนติบอดีปฐมภูมิ ด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (Secondary antibody) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) หลังชะล้าง membrane จนสะอาดเติม substrate ECL (enhanced chemiluminescence's kit) แล้วประกบลงบนแผ่นฟิล์ม ในเวลาที่เหมาะสม (Waiwut et al., 2011)

## บทที่ 4

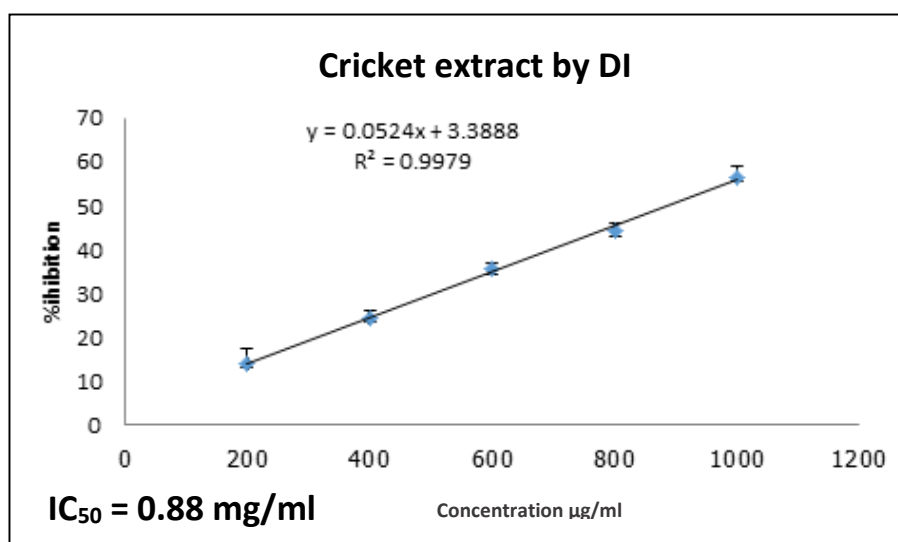
### ผลการวิจัย

#### 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals; DPPH assay)

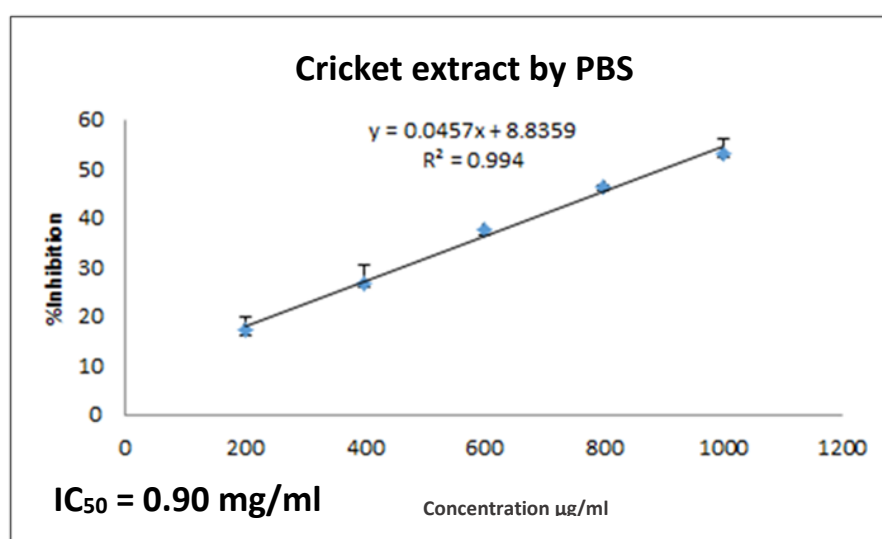
การทดสอบในครั้งนี้จะใช้อนุมูลอิสระ DPPH เป็นสารตั้งต้นและเมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากจิ้งหรีดจะทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ที่มีสีม่วงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และแสดงผลเป็นความเข้มข้นของสารสกัดจิ้งหรีดที่สามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ 50% ( $IC_{50}$ ) พบว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล , DI และ PBS มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า  $IC_{50}$  ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.15 , 0.88 และ 0.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.1-4.3) การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสารสกัดจากจิ้งหรีดด้วยน้ำ DI มีฤทธิ์ดีที่สุด และในการทดสอบครั้งนี้ได้ใช้โทรล็อกซ์ (trolox) เป็นสารมาตรฐาน จากการทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโทรล็อกซ์ พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ 50% ( $IC_{50}$ ) ที่ความเข้มข้น 31.65 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 4.4)



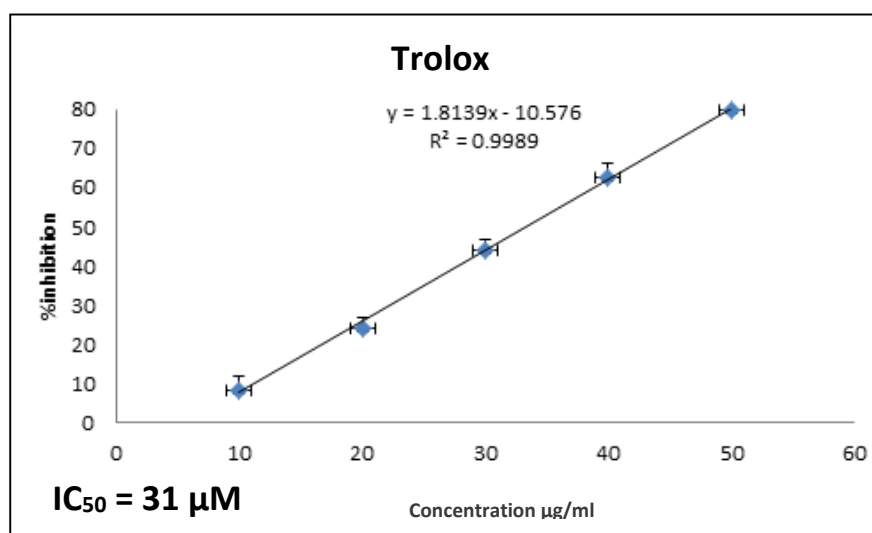
ภาพที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n=3)



ภาพที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดจากจิ้งหรีด ที่สกัดด้วยน้ำ (DI) ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงข้อมูลด้วยค่า mean±SD (n=3)



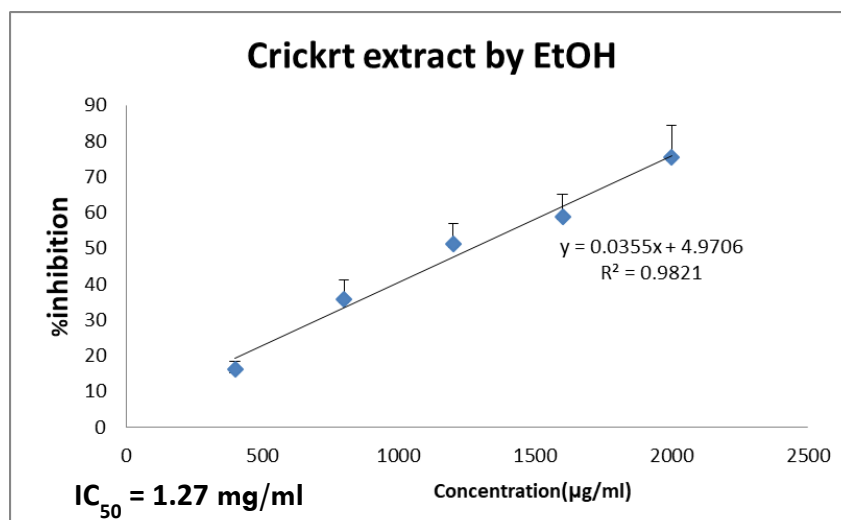
ภาพที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดจากจิ้งหรีด ที่สกัดด้วย phosphate - buffered saline (PBS) ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงข้อมูลด้วยค่า mean±SD (n=3)



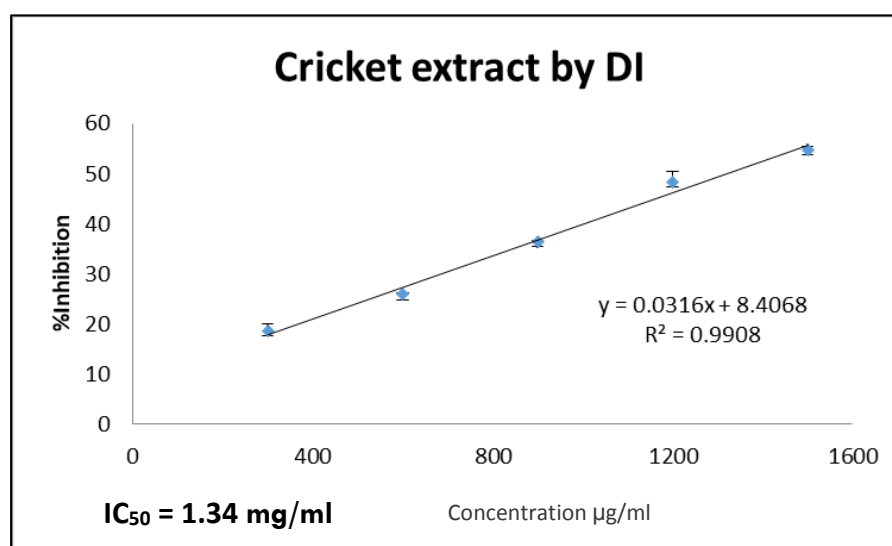
ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารโทรลล็อกซ์  
ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงข้อมูลด้วยค่า mean±SD (n=3)

#### 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (2,2 azino-Bis (3ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

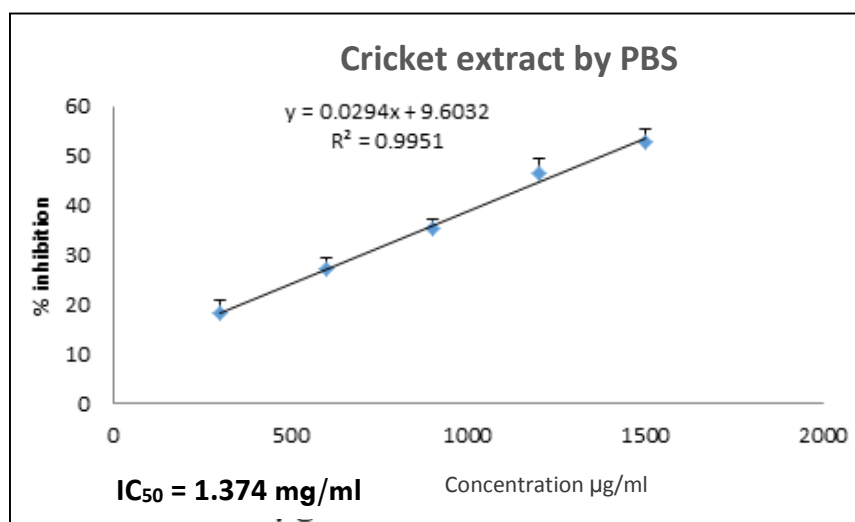
เป็นการทดสอบหาอนุมูลอิสระอีกวิธีหนึ่ง โดยวิธีนี้จะใช้อนุมูลอิสระ ABTS (2,2 azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจิ้งหรีด ซึ่งจะทำให้ ABTS ที่มีสีเขียวเปลี่ยนเป็นไม่มีสี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และแสดงผลเป็นความเข้มข้นของสารสกัดจิ้งหรีดที่สามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ 50% ( $IC_{50}$ ) สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล DI และ PBS พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ 50% ( $IC_{50}$ ) ที่ความเข้มข้น 1.27 , 1.34 และ 1.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5-4.7) การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS โดยสารสกัดจากจิ้งหรีดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ดีที่สุด และในการทดสอบครั้งนี้ได้ใช้โทรลล็อกซ์ (trolox) เป็นสารมาตรฐาน จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของโทรลล็อกซ์ พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ 50% ( $IC_{50}$ ) ที่ความเข้มข้น 46 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 4.8)



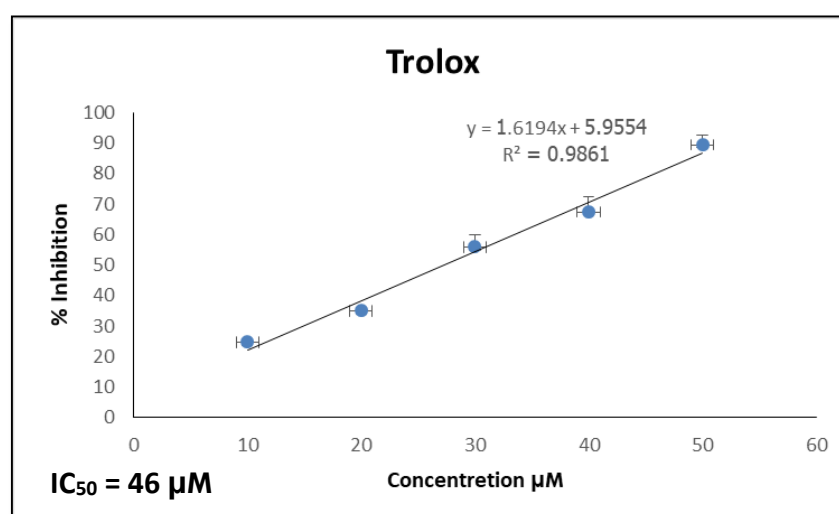
ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS แสดงข้อมูลด้วยค่า mean±SD (n=3)



ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยสกัด DI ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS แสดงข้อมูลด้วยค่า mean±SD (n=3)



ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS แสดงข้อมูลด้วยค่า mean±SD (n=3)

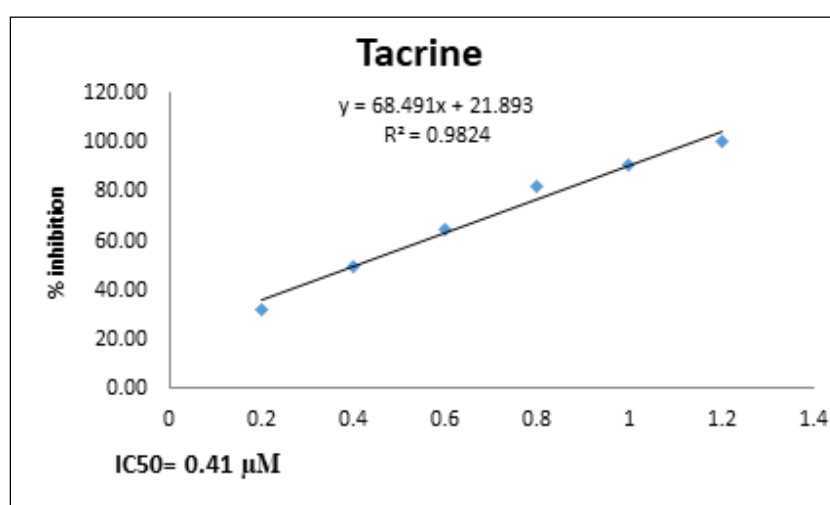


ภาพที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารโทรล๊อกซ์ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS แสดงข้อมูลด้วยค่า mean±SD (n=3)

#### 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase)

การทดลองนี้เป็นการทดสอบสารสกัดจากจิ้งหรีดเพื่อหาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นตัวทำลายสารสื่อประสาทที่ช่วยในการส่งกระแสประสาท การทดสอบมีหลักการ คือ เอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสจะเปลี่ยนแอซิติลโคลีนให้เป็นโฮอีโคลีน

(thiocholine) และอะซิเตท (acetate) และ ไธโอโคลีนจะทำปฏิกิริยากับ 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) เพื่อให้เกิดสีเหลืองและวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 405 nm และวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 30 วินาทีโดยใช้ tacrine เป็นสารมาตรฐาน จากการทดลองพบว่า tacrine สามารถยับยั้งเอนไซม์ แอซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.4 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 4.9) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย เอทานอล DI และ PBS ที่ความเข้มข้น 1,10,100 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส

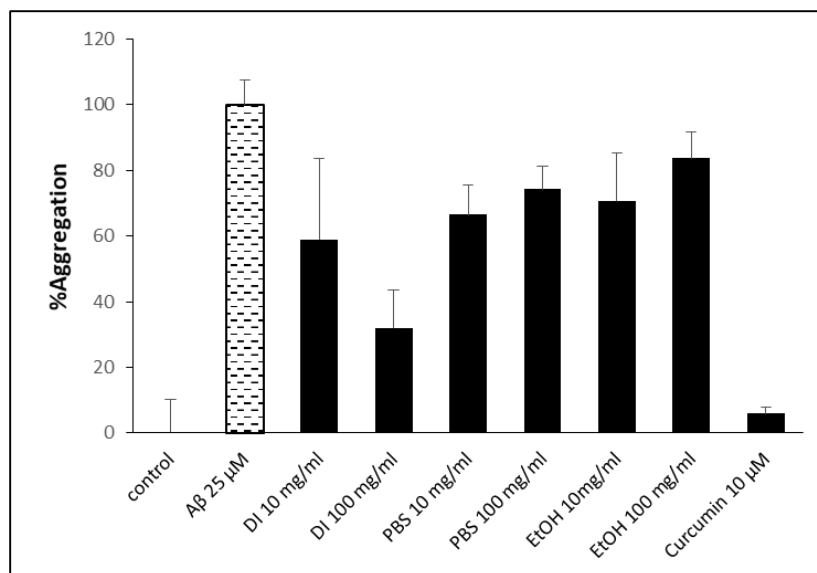


ภาพที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของ tacrine ต่อการยับยั้งเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเทอเรส แสดงข้อมูลด้วยค่า mean±SD (n=3)

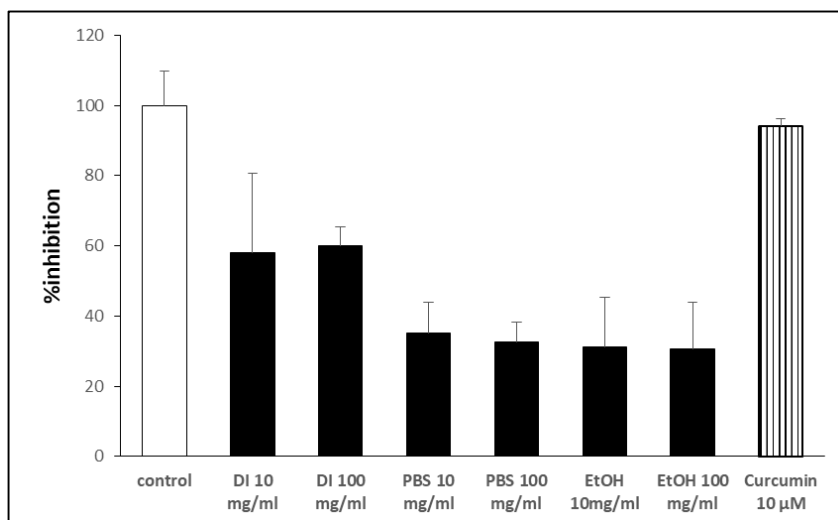
#### 4.4 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของ beta amyloid

ในการทดสอบนี้เป็นการตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อเบต้าอะมัยลอยด์ ( $A\beta$ ) ที่เกิดการเกาะกลุ่มกัน ด้วยวิธี ไธโอฟลาวิน ที (thioflavin T) เมื่อ thioflavin T อยู่ในรูปประจุบวกจะสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ที่เกิดการเกาะกลุ่มกันได้ โดยการทดลองนี้จะใช้เคอร์คูมิน (curcumin) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย เอทานอล ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะมัยลอยด์ได้ ร้อยละ 31.11 และ -30.10 ตามลำดับ สารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย DI ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะมัยลอยด์ได้ ร้อยละ 50.03 และ 60.10 ตามลำดับ สารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะมัยลอยด์ได้ ร้อยละ 35.17 และ 32.56

ตามลำดับ (ภาพที่ 4.11) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะไมลอยด์ได้โดยสารสกัดจิ้งหรีดด้วยน้ำ DI ให้ผลยับยั้งดีที่สุด



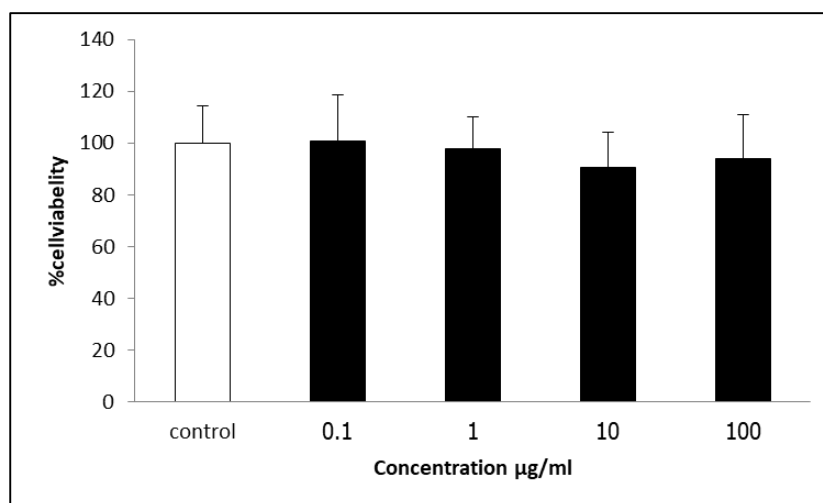
ภาพที่ 4.10 ผลของสารสกัดจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ 3 กลุ่ม ได้แก่ สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ (DI) สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย phosphate buffer (PBS) สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย เอทานอล (EtOH) จากจิ้งหรีดต่อ aggregation ของเบต้าอะไมลอยด์ โดยใช้เคอร์คูมิน 10 ไมโครโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n=3)



ภาพที่ 4.11 ผลของสารสกัดจิ้งหรีดพันธุ์ทองคำ 3 กลุ่ม ได้แก่ สารสกัดน้ำจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ (DI) สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย phosphate buffer (PBS) และสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล (EtOH) ต่อการต้านการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมีลอยด์ โดยใช้เคอร์คูมิน 10 ไมโครโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n=3)

#### 4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อเซลล์ประสาท SH-SY5Y

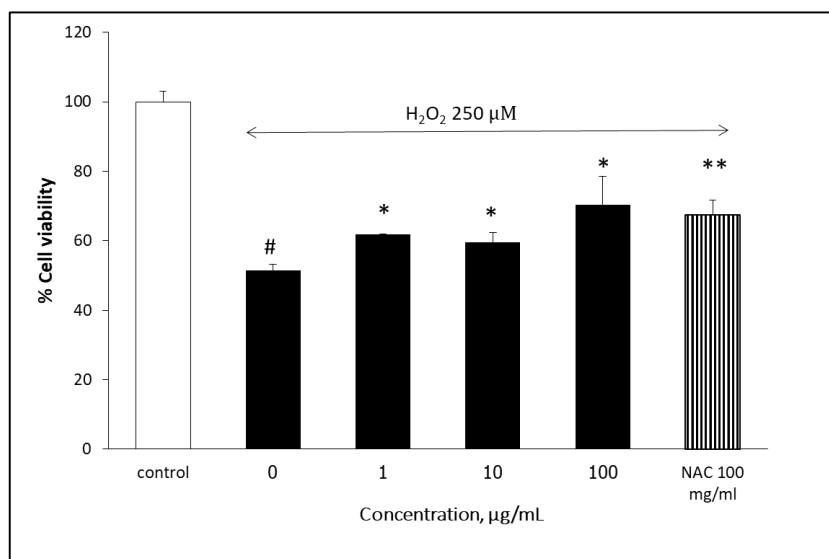
ในการทดสอบครั้งนี้ได้ใช้เซลล์ human neuroblastoma cell (SH-SY5Y) แล้วเติมสารสกัดจากจิ้งหรีดที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากจิ้งหรีดที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท human neuroblastoma cell (SH-SY5Y)



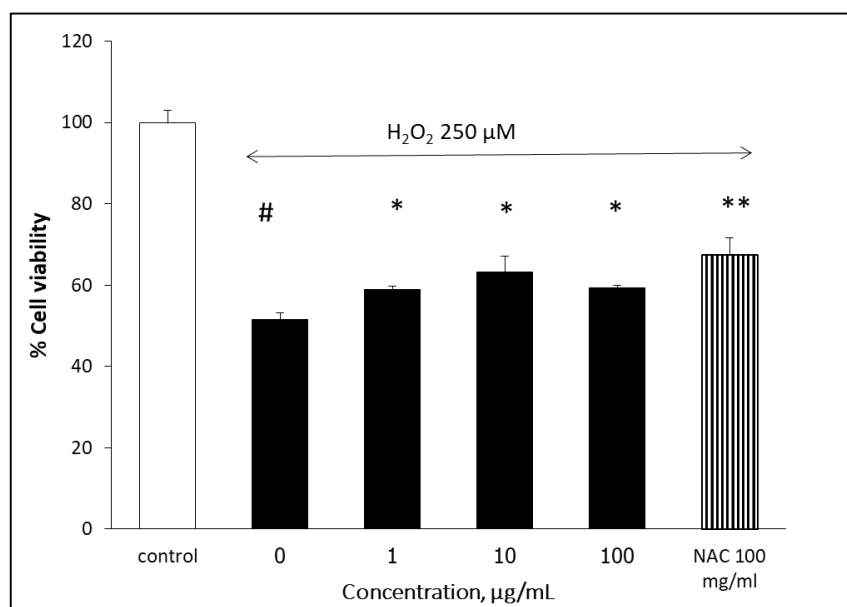
ภาพที่ 4.12 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ต่อความเป็นพิษเซลล์ประสาท SH-SY5Y

#### 4.6 ผลการศึกษาสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อฤทธิ์การป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide)

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลในการป้องกันการทำลายเซลล์ใน human neuroblastoma cell (SH-SY5Y) และใช้ N-actyl cysteine (NAC) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่ม ที่ความเข้มข้น 1 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p\text{-value} < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดมีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

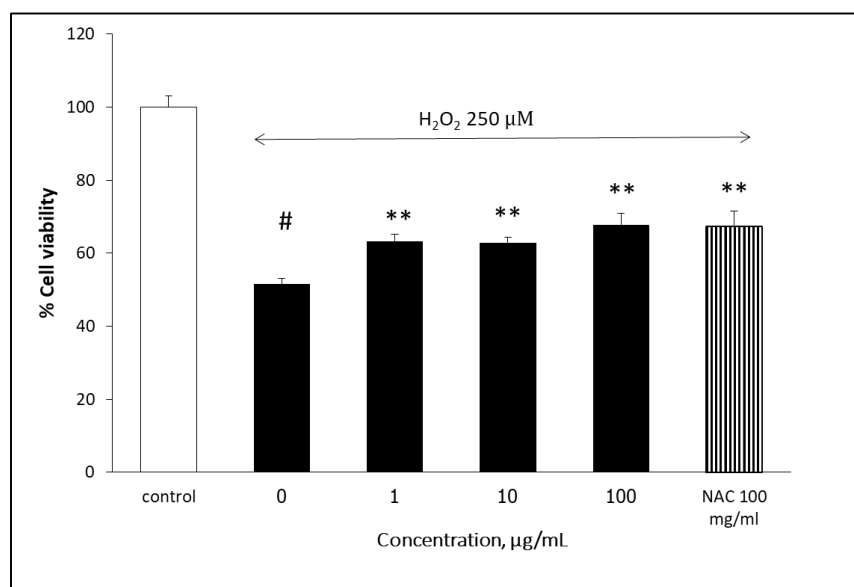


ภาพที่ 4.13 ผลของสารสกัดเอทานอลจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท SH-SY5Y เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 250 ไมโครโมลาร์ ใช้ NAC 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวที่ p-value <0.01 (#) และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ p-value <0.05 (\*) และ p-value <0.01 (\*\*)



ภาพที่ 4.14 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ (DI) ที่ความเข้มข้น 1,10 และ 100

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท SH-SY5Y เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 250 ไมโครโมลาร์ ใช้ NAC 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการเติมสารใดๆลงไปกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวที่ p-value <0.01 (#) และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ p-value <0.05 (\*) และ p-value <0.01 (\*\*)

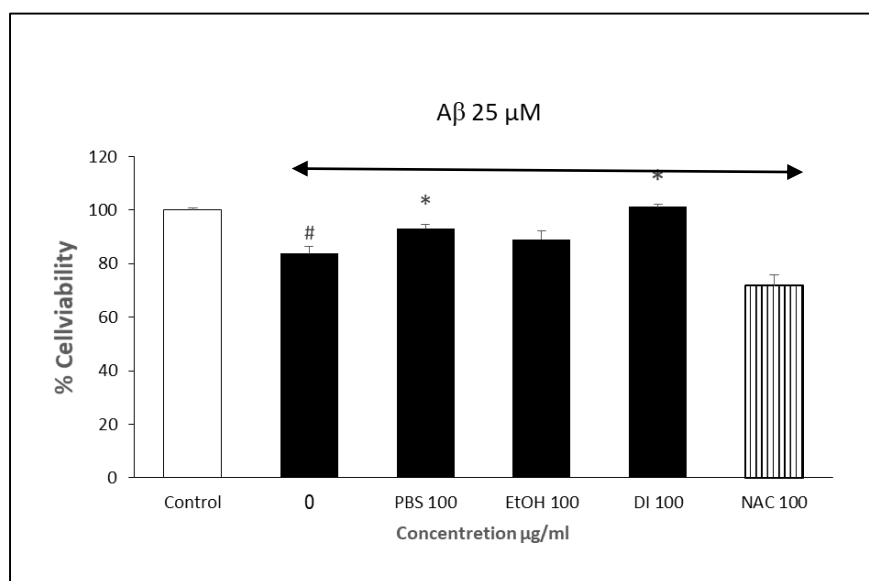


ภาพที่ 4.15 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS (Phosphate-buffered saline) ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท SH-SY5Y เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 250 ไมโครโมลาร์ ใช้ NAC 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นสารมาตรฐาน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการเติมสารใดๆ ลงไปกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวที่ p-value <0.01 (#) และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ p-value <0.01 (\*\*)

#### 4.7 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท SHSY-5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์ (Amyloid beta)

ในการทดลองนี้ใช้เซลล์ human neuroblastoma cell (SHSY-5Y) โดยทำการบ่มเซลล์ใน 96 well plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 2 วัน ทำให้เกิดกระบวนการ beta-amyloid aggregation เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำสารสกัดจากจิ้งหรีดมาทดสอบแล้วทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเติม aggregated beta amyloid 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปเพื่อให้เกิดการทำลายเซลล์ประสาท ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำไปเติมสารทดสอบ WST-8 เพื่อศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์พบว่าสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากเบต้าอะไมลอยด์โดยมีอัตราการมีชีวิตรอดร้อยละ 95 สารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย DI ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจาก

เบต้าอะมัยลอยด์โดยมีอัตราการมีชีวิตรอดร้อยละ 100 สารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากเบต้าอะมัยลอยด์โดยมีอัตราการมีชีวิตรอดร้อยละ 97 (ภาพที่ 4.16) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจิ้งหรีดสามารถป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่เหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะมัยลอยด์ โดยสารสกัดด้วยน้ำ DI มีฤทธิ์สูงสุด

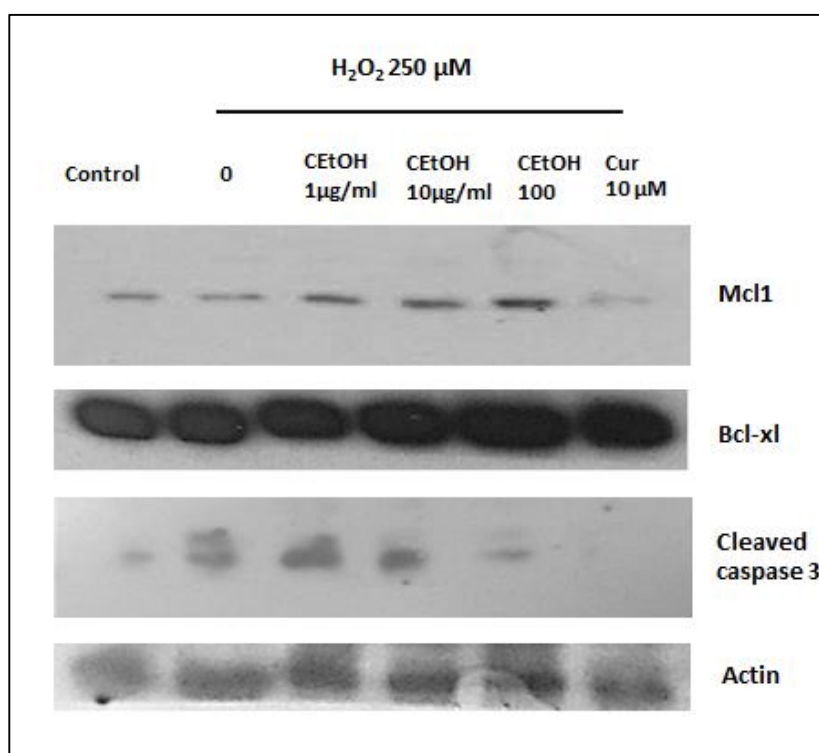


ภาพที่ 4.16 ผลของสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย Phosphate-buffered saline (PBS)เอทานอล (EtOH) และน้ำ (DI) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากเบต้าอะมัยลอยด์ 25 ไมโครโมลาร์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการเติมสารใดๆลงไปกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวที่  $p\text{-value} < 0.01$  (#) และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ( $p\text{-value} < 0.05$  \*) และ ( $p\text{-value} < 0.01$  \*\*)

#### 4.8 การศึกษาผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อโปรตีนที่ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพอโทซิสของเซลล์ประสาท SHSY-5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide)

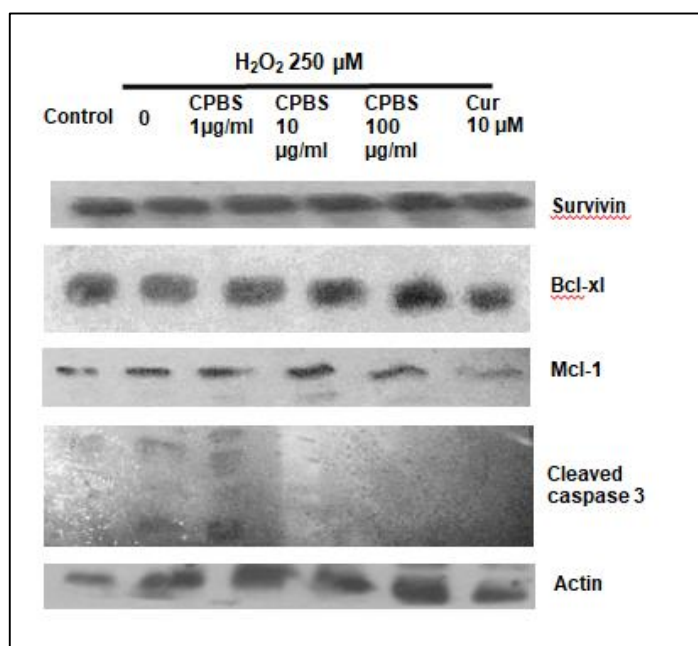
เป็นการศึกษากลไกของสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล (Ethanol) ต่อโปรตีนในวิถีการตายแบบอะพอพอโทซิสผ่านวิถี intrinsic pathway โดยศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในวิถีอะพอพอโทซิส ได้แก่ Mcl1, Bcl-xL, และ caspase-ในเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การทดลองเริ่มจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทด้วย

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที โดยมี เคอร์คูมิน ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ถูกบ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทผ่านการกระตุ้นวิธี Mcl1, Bcl-xl และ caspase-3 และส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในที่สุด และพบว่าเซลล์ที่เติมสารเคอร์คูมินและสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล เหนียวนำไปเกิดเซลล์ตายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีการเพิ่มการแสดงออกของ Mcl1 Bcl-xl และยับยั้งการกระตุ้น caspase-3 แต่ เคอร์คูมินไม่มีผลในการเพิ่มการแสดงออกของ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4.17) ผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากการถูกเหนียวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผ่าน การกระตุ้นการแสดงออกของ Mcl1, Bcl-xl และยับยั้งการกระตุ้นของ caspase-3 ทำให้ไม่เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส



ภาพที่ 4.17 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีด ด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิตร ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโทซิสเมื่อถูกเหนียวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ เคอร์คูมิน(curcumin) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน

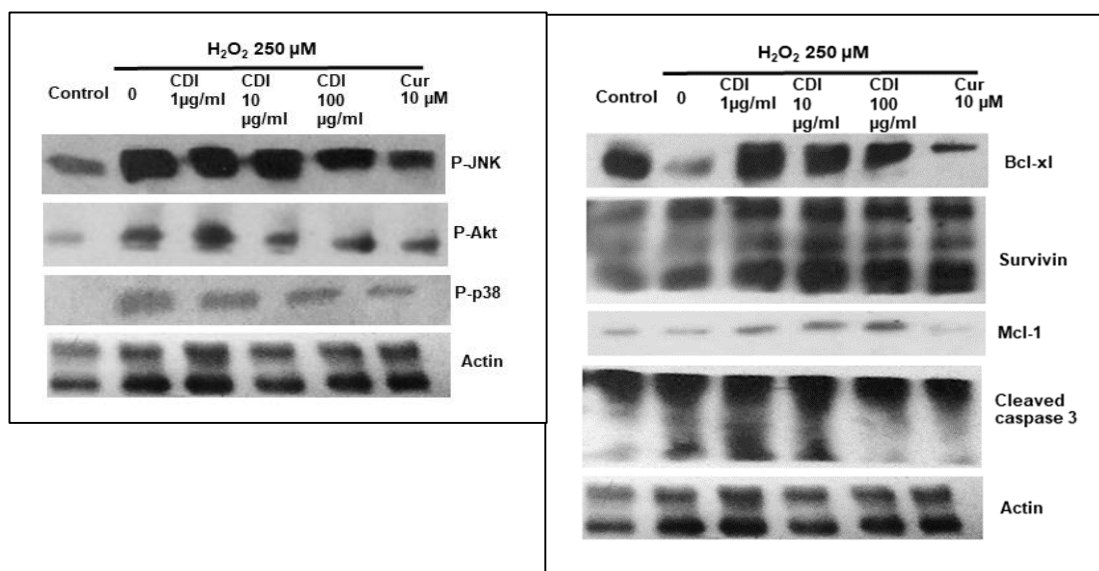
สำหรับการศึกษากลไกการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทของสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS ต่อโปรตีน Survivin Mcl1, Bcl-xl, และ caspase-3 ในเซลล์ประสาทจากการถูกเหนี่ยวนำด้วย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การทดลองเริ่มจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที โดยมีเคอร์คูมินความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ถูกบ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทผ่าน Survivin, Mcl1, Bcl-xl และ caspase-3 นอกจากนี้การบ่มสารเคอร์คูมิน และสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ตายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่าสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS เพิ่มการแสดงออกของ Survivin, Mcl1 Bcl-xl และยับยั้งการการตัดสารเปปไทด์ของ caspase-3 แต่เคอร์คูมินไม่มีผลในการเพิ่มการแสดงออกของ Mcl1 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ โดยยับยั้ง การแสดงออกของ Survivin, Mcl1 และ Bcl-xl ทำให้เกิดการกระตุ้นของ caspase-3 และส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในที่สุด และผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS พบว่าสามารถเพิ่มการแสดงออกของ Survivin, Mcl1 และ Bcl-xl และยับยั้งการกระตุ้น caspase-3 ในเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS สามารถยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากการถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผ่าน Survivin, Mcl1 Bcl-xl และ caspase-3



ภาพที่ 4.18 ผลของสารสกัดจากจิงหรีดที่สกัดด้วย PBS (Phosphate-buffered saline) ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโทซิสเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ ใช้เคอร์คูมิน (curcumin) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน

และการศึกษากลไกของสารสกัดจิงหรีดที่สกัดด้วย DI ต่อโปรตีน JNK, Akt, P38, Survivin, Mcl1, Bcl-xl, และ caspase-3 ในเซลล์ประสาทจากการถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 28 การทดลองเริ่มจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดจากจิงหรีดที่สกัดด้วยน้ำ DI ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที โดยมีเคอร์คูมิน ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ถูกบ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทผ่าน JNK, Akt, Survivin, P38, Mcl1, Bcl-xl, และ caspase-3 และสารสกัดจากจิงหรีดที่สกัดด้วยน้ำ DI ในเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าสารสกัดจิงหรีดที่สกัดด้วยน้ำ DI สามารถยับยั้งการเติมฟอสเฟตให้กับ JNK (p-JNK), Akt (p-Akt), และ P38 (p-P38) จึงทำให้ลดการกระตุ้น caspase-3 ที่ชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส และยังช่วยเพิ่มการแสดงของ Survivin, และ Mcl1, Bcl-xl ซึ่งทำให้ยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าสารสกัดจากจิงหรีดที่สกัดด้วย DI สามารถยับยั้งการตายของเซลล์

ประสาทจากการถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผ่าน JNK, Akt, P38, Survivin, Mcl1, Bcl-xl, และ caspase-3

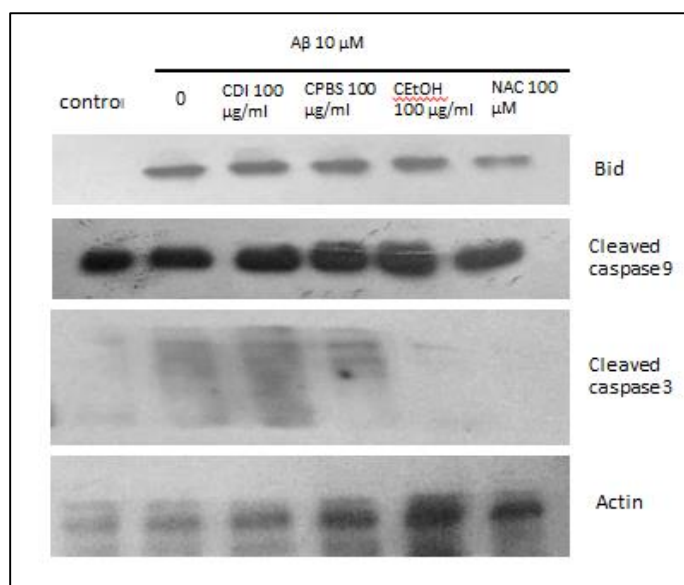


ภาพที่ 4.19 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ DI ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอพโทซิสเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ โดยใช้เคอร์คูมิน (curcumin) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน

#### 4.9 การศึกษาสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อโปรตีนที่ทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ประสาท SHSY-5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะมัยลอยด์ (Beta-amyloid)

การทดลองนี้ศึกษาถึงกลไกของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอานอล DI และ PBS ต่อการแสดงออกของโปรตีน Bid, caspase-9 และ caspase-3 ของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะมัยลอยด์ การทดลองเริ่มจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย เอานอล, DI และ PBS ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทด้วยเบต้าอะมัยลอยด์ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยมี N-acetyl cysteine ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลอง พบว่าเบต้าอะมัยลอยด์เหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้น caspase-3 และ caspase-9 เพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้มีการกระตุ้น Bid ซึ่งส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในที่สุด โดยสารสกัดจากจิ้งหรีด เอานอล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นของ caspase-3 ได้ดีกว่าสารสกัดจิ้งหรีด

ด้วยน้ำ DI และ PBS ในเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์ แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ bid และ caspase-9 ได้ ผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล สามารถยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจากการถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์ผ่านการยับยั้งการกระตุ้น caspase-3



ภาพที่ 4.20 ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอานอล DI และ PBS ที่ความเข้มข้น 100

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด

อะพอพโทซิสเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์ความเข้มข้น

10 ไมโครโมลาร์ ใช้ N-acetylcysteine ความเข้มข้น

100 ไมโครโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการทดลอง

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's Disease) เป็นโรคที่ทำให้เกิดกลุ่มอาการทางสมองเสื่อมในผู้สูงอายุที่พบบ่อยที่สุดในโลกทางตะวันตก (Helbert et al., 2001) โรคนี้ในวันข้างหน้าจะเป็นปัญหาเพิ่มขึ้นเพราะเป็นโรคที่พบในประชากรที่มีอายุมาก ในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของโรคนี้ในผู้สูงอายุเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ทำให้โรคอัลไซเมอร์ถูกจัดเป็นโรคที่สร้างปัญหาทางสาธารณสุขระดับสำคัญของประเทศ ซึ่งสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาได้มีความพยายามวิจัยเพื่อศึกษากลไกการเกิดโรคนี้ พบว่ามีหลายสมมติฐานที่นำมาใช้อธิบายสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพของโรค โดยพบว่าอาจเกี่ยวข้องกับการลดลงของสารสื่อประสาทแอสिटิลโคลีน (Khachaturian, 1985) การสะสมของเบต้าอะมัยลอยด์ (Bourdel-Marchassonet al., 2001) การสะสมของ neurofibrillary tangle (Bourdel-Marchasson et al., 2001) และการเกิดภาวะ oxidative stress (Praticoet al., 2001) ซึ่งปัจจุบันยาที่มีขายตามท้องตลาด หรือยาที่ได้รับการรับรองโดยองค์การอาหารและยา มีอยู่ 4 ชนิด คือ donepezil, galantamine, rivastigmine และ memantin ซึ่งยาเหล่านี้ ออกฤทธิ์เพียงกลไกเดียวจึงยังไม่สามารถรักษาโรคอัลไซเมอร์ให้หายขาดได้ เนื่องจากโรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่ซับซ้อนเกิดจากหลายสาเหตุ ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนายาที่สามารถออกฤทธิ์ได้หลายกลไกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคอัลไซเมอร์ ในต่างประเทศได้มีการพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลายมาใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ รวมทั้งการนำพืชสมุนไพรหลายชนิดมาใช้ร่วมกันเพื่อเสริมฤทธิ์ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ ใบแปะก๊วย (Xu Liu and et al. 2015) พรหมมี *Bacopa monniera* (Sharma R and et al. 1987.) ว่านน้ำ *Acorus calamus* L. (Oh MH and et al. 2004) การใช้การรักษาร่วมกันระหว่าง erythropoietin และ curcumin ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (Doaa M and et al. 2015) ในส่วนของสัตว์วัตถุ ได้มีการใช้ propolis ในการศึกษาและพัฒนาเพื่อเป็นยารักษาอัลไซเมอร์ (Junjun Ni and et al. 2017) และการใช้สารสกัดของ Black Ant ในการศึกษาและพัฒนาเพื่อเป็นยารักษาอัลไซเมอร์ และในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำมาใช้ในการศึกษา เนื่องจากจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำเป็นแมลงเศรษฐกิจที่เพาะพันธุ์ และจำหน่ายในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ และจังหวัดใกล้เคียง รวมทั้งจิ้งหรีดเป็นสัตว์ที่เลี้ยงง่าย มีระยะในเวลากการเติบโตสั้น รสชาติดี และสามารถประยุกต์บริโภคได้หลากหลายรูปแบบเช่น จิ้งหรีดทอด น้ำพริกจิ้งหรีด ข้าวเกรียบจิ้งหรีด คูกี้จิ้งหรีด เป็นต้น จิ้งหรีด

มีองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุต่าง ๆ จิ้งหรีดมีกรดไขมันที่สำคัญ เช่น กรด oleic, linoleic และ  $\gamma$ -linoleic (Ahn et al.2000) ซึ่งเป็นไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 ที่ช่วยป้องกันโรคสมองเสื่อม หรือ โรคอัลไซเมอร์ (Lee et al., 2009; Oliver et al., 2010) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า สารสกัดจิ้งหรีดยังมีฤทธิ์ต้านอาการบวม (anti-edema effect) และต้านการเกิดออกซิเดชัน (anti-oxidation) ในระดับ DNA ซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคอัลไซเมอร์ โดยการลดระดับของ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) และเพิ่มการแสดงออกของยีน reticulon 4 (Rtn 4) : ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในหนูทดลอง รวมทั้งมีผลกระตุ้นการทำงานของ antioxidant enzyme ได้แก่ catalase, superoxide dismutase และ glutathione S-transferase (Ahn et al, 2015; Taufek et al., 2016) จากข้อมูลด้านฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจิ้งหรีด และฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบของจิ้งหรีด จึงคาดว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดน่าจะมีศักยภาพในการป้องกันหรือรักษาอัลไซเมอร์ได้ ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจศึกษาผลของสารสกัดจากจิ้งหรีด พันธุ์ทองดำต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับ โรคอัลไซเมอร์ ได้แก่ การศึกษาฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเตอเรส ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ ฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทอันเนื่องจากภาวะเครียดออกซิเดชัน และเนื่องจากพิษของเบต้าอะมัยลอยด์ รวมทั้งศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทของสารสกัดจากจิ้งหรีด

### 5.1 การศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากจิ้งหรีด

ในสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ พบว่ามีปริมาณอนุมูลอิสระ และโลหะหนักบางชนิดในสมองมากกว่าคนปกติ ปัจจัยเหล่านี้มีผลกระตุ้นการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน นำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ ซึ่งอนุมูลอิสระ คืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว ไม่มีคู่ (unpaired electron) ทำให้มีความไวในการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ในร่างกาย ทำให้เกิดความเสียหายต่อชีวโมเลกุล เช่น สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับลิพิด (lipid peroxidation) มีผลทำให้เซลล์เมมเบรนของเซลล์ประสาทถูกทำลาย (Ames et al., 1993) มีผลทำลายไมโทคอนเดรียส่งผลให้เกิดความผิดปกติของระบบการเผาผลาญพลังงานเกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่าเบต้าอะมัยลอยด์ที่พบในโรคอัลไซเมอร์ สามารถกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน โดยเบต้าอะมัยลอยด์จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ( $\cdot\text{OH}$ ) ส่งผลกระตุ้นให้เกิดภาวะ lipid peroxidation (Ohnishi, Takano, 2004) ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะส่งผลให้สารชีวโมเลกุลเกิดความเสียหาย และเกิดการตายของเซลล์ประสาทในที่สุด จึงมีการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ (Floyd, Hensley, 2002)

ดังนั้นแนวทางในการป้องกันการเกิดพยาธิสภาพอันเนื่องจากภาวะเครียดออกซิเดชัน คือ สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันมีการศึกษาการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกันมากขึ้น ซึ่งมีหลายวิธีด้วยกัน แต่ละวิธีจะมีกลไกที่แตกต่างกันออกไป โดยปกติมักจะใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผล ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอช (ABTS radical cation decolorization assay) และ DPPH (DPPH radical cation decolorization assay) มีกลไกยับยั้งอนุมูลอิสระโดยทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้นซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ และยังถือได้ว่าเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิด

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เอทานอล DI และ PBS ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่ม มีฤทธิ์ในการกำจัดทั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจิ้งหรีดทั้ง 3 ชนิด มีองค์ประกอบเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระโดยให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (electron transfer) และสารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระโดยให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ (hydrogen transfer) สำหรับฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า จิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ DI มีฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจิ้งหรีดด้วย PBS และ ethanol ตามลำดับ ในขณะที่ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS พบว่า จิ้งหรีดที่สกัดด้วย ethanol มีฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจิ้งหรีดด้วยน้ำ DI และ PBS ตามลำดับ จากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ แต่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ essential amino acid และ fatty acid กลุ่ม omega 6 ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของจิ้งหรีด โดยพบว่า amino acid บางชนิด เช่น histidine, methionine, lysine, tryptophan, phenylalanine, threonine และ fatty acid กลุ่ม omega 6 ได้แก่ linoleic acid, oleic acid และ  $\gamma$ -linoleic มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน (Aydemir et al., 2008) ดังนั้นจึงคาดว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำบางส่วนอาจมาจากสารเหล่านี้

## 5.2 การศึกษาสารสกัดจากจิ้งหรีดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การเกิดภาวะออกซิเดชันในเซลล์ประสาทจะส่งผลให้เกิดการเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาท ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นการหลั่งของสารออกซิเดชัน โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารตั้งต้น (precursor) ของอนุมูลอิสระออกซิเจน (oxygen free radical) ที่อยู่ในเซลล์ ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นจะทำให้เกิดการแตกตัวให้กลายเป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ที่ก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และเกิดความเสียหายต่อเซลล์ตามมา ส่งผลให้เกิด lipid peroxidation ทำให้เกิดการกระตุ้นการอักเสบของเซลล์ประสาททำให้เข้าสู่กระบวนการอะพอพโทซิส จึงเกิดการตายของเซลล์ประสาทในที่สุด (Dennis W. Dickson 2016) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาเหนี่ยวนำให้เซลล์ประสาทตายด้วยภาวะเครียดออกซิเดชัน

N-acetyl-cysteine (NAC) เป็นกรดอะมิโนสังเคราะห์ที่มีหมู่ thiol ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์ได้ดี นอกจากนี้พบว่า NAC ยังมีฤทธิ์ป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยภาวะ oxidative stress และจากพิษของเบต้าอะมัยลอยด์ ดังนั้นการศึกษานี้ จึงใช้ NAC ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน จากการวิเคราะห์สารสกัดจากจิ้งหรีดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าสารสกัดจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่ม ที่ความเข้มข้น 1 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p\text{-value} < 0.05$  เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดนั้นนอกจากจะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทแล้วยังมีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเนื่องจากการเหนี่ยวนำของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ สารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ DI PBS และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์ที่ถูกบ่มด้วยสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ DI มีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์มากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย phosphate-buffered saline และเอทานอล ตามลำดับ ซึ่งผลสอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ก่อนหน้านี้ ดังนั้นฤทธิ์ป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยภาวะ oxidative stress ของสารสกัดจิ้งหรีด ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (radical scavenging action) ของสารสกัด แต่จากการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นระดับมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในการทดลองกับเซลล์ พบว่าใช้เพียง ระดับไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การทดสอบในหลอดทดลอง อนุมูลอิสระที่นำมาทดสอบเป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวสูง มีความไวในการทำ

ปฏิกิริยาต่ำกว่าอนุมูลอิสระในเซลล์มาก นอกจากนี้กลไกในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ของสารสกัด ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้กล่าวไปแล้ว และอาจเกิดผ่านกลไกอื่นร่วมด้วย เช่นกลไกการควบคุมภายในเซลล์ ซึ่งจะได้กล่าวต่อไปในการศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ โดยวิธี Western blotting analysis

### 5.3 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากจิ้งหรีดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเตอเรส

สาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคอัลไซเมอร์อาจเกิดจากความผิดปกติของระบบ cholinergic system โดยพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์จะมีระดับของสารสื่อประสาทแอซิติลโคลีนลดลงอย่างมาก ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ความสามารถในการจำและการใช้เหตุผลของผู้ป่วยลดลง (Wilkinson et al., 2004) การลดลงของระดับแอซิติลโคลีนอาจเกิดจากมีกระบวนการการสังเคราะห์แอซิติลโคลีนลดลง หรือเกิดจากการทำลายสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนโดยเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเตอเรสมากเกินไป ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการป้องกันการเกิดพยาธิสภาพอันเนื่องจากการลดลงของสารสื่อประสาทแอซิติลโคลีนคือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส เพื่อลดการทำลายสารสื่อประสาทชนิดนี้

Tacrine เป็นยาตัวแรกที่น่าสนใจมาใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ระดับปานกลาง มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเตอเรส ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ tacrine เป็นสารมาตรฐาน จากการทดลองพบว่า tacrine สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเตอเรส ได้ 50% ( $IC_{50}$ ) ที่ความเข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเตอเรส ของสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล น้ำ DI และ PBS ที่ความเข้มข้น 1,10,100 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอซิติลโคลีนเอสเตอเรส

### 5.4 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อการต้านการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์

การสะสมของ beta amyloid เป็นสาเหตุหลักของโรคอัลไซเมอร์ (Hardy, Allsop, 1991) beta amyloid เป็นส่วนประกอบของโปรตีนต้นกำเนิดอะมัยลอยด์ (amyloid precursor protein; APP) โปรตีนนี้เป็นทรานสเมมเบรนโปรตีน (transmembrane protein) ที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท โปรตีน APP มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต การดำรงชีวิต และการซ่อมแซมของเซลล์ประสาท ซึ่งในโรคอัลไซเมอร์จะมีการสลายโปรตีน APP (proteolysis) โดยตัดสาย APP ด้วยเอนไซม์กลุ่ม secretase ได้เป็น beta amyloid ซึ่งจะจับตัวกันหนาแน่นอยู่นอกเซลล์ประสาทเรียกว่า senile plaques (Ohnishi, Takano, 2004) ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ โดยพบว่า beta amyloid จะทำลาย

เซลล์ประสาทโดยการกระตุ้นการปลดปล่อยอนุมูลอิสระออกมา ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นและการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ ในการทดสอบนี้เป็นการตรวจสอบหาโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ที่เกิดการเกาะกลุ่มกัน โดยไธโอฟลาวิน ที (thioflavin T) เมื่ออยู่ในรูปประจุบวกจะสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ที่เกิดการเกาะกลุ่มกัน

เคอร์คูมิน (curcumin) เป็นสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoid) จากการศึกษาของ Park et al. (2001) พบว่าเคอร์คูมินสามารถลดการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์ได้ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จะใช้เคอร์คูมิน (curcumin) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน จากการวิเคราะห์สารสกัดจิ้งหรีดต่อการต้านการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์พบว่าสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ DI ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะมัยลอยด์ได้ดีที่สุดที่ (60.10%) รองลงมาคือ สารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS (32.56%) และสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยด้วยเอทานอล (30.58%) และจากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบการทดสอบฤทธิ์การต้านเบต้าอะมัยลอยด์ของสารสกัดจิ้งหรีด แต่พบว่ามีสารกลุ่ม short peptide หลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะมัยลอยด์ได้ดี ได้แก่ KLVFF (Tjernberg et al., 1996), LVFFA (Soto C. et al., 1996) LPFFD (Soto C. et al., 1999) ดังนั้นฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะมัยลอยด์ของสารสกัดจิ้งหรีดอาจมาจาก peptide ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในจิ้งหรีด

## 5.5 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากจิ้งหรีดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะมัยลอยด์

การสะสมของเบต้าอะมัยลอยด์เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ (Ohnishi and Takano, 2004) โดยพบว่าเบต้าอะมัยลอยด์ที่เกิดการเกาะกลุ่มกันสามารถกระตุ้นให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำได้โดยตรง นอกจากนี้ยังพบว่าเบต้าอะมัยลอยด์จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ส่งผลกระตุ้นให้เกิดภาวะ lipid peroxidation และเบต้าอะมัยลอยด์ยังสามารถรบกวนสมดุลของแคลเซียมไอออน จึงทำให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ประสาทเช่นกัน (Mattson, 2010) จึงมีผลต่อการกระตุ้นการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากเบต้าอะมัยลอยด์ในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ DI ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้มากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS และสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงสอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์ในหลอดทดลอง ดังนั้นฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยพิษของเบต้าอะมัยลอยด์ของสารสกัดจิ้งหรีดอาจมาจากฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าอะมัยลอยด์ นอกจากนี้

จากการทบทวนวรรณกรรมยังพบว่าเบต้าอะมัยลอยด์ สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น โดยไปรบกวนสมดุลของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ (Mattson, 2004) มีผลทำให้เซลล์ประสาทเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและตายในที่สุด และจากการที่สารสกัดจิ้งหรีดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะมัยลอยด์ของสารสกัดจิ้งหรีด นอกจากมาจากฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเบต้าอะมัยลอยด์แล้ว อาจมาจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

## 5.6 การศึกษาผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อโปรตีนในวิถีการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเบต้าอะมัยลอยด์

อะพอพโทซิสเป็นขบวนการตายที่ถูกควบคุมโดยยีน มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและรักษาสมดุล ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์แต่ถ้าการควบคุมการตายแบบอะพอพโทซิสที่ไม่เหมาะสมก็จะก่อให้เกิดโรคเช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน โรคอโตอิมมูน และโรคมะเร็งชนิดต่างๆ วิถีการตายแบบอะพอพโทซิสมี 2 แบบคือ 1) วิถี จากภายนอกที่เหนี่ยวนำโดย death receptor หรือ Extrinsic pathway และ 2) วิถีจากภายในที่มีไมโทคอนเดรียกับอะพอพโทโซมเป็น ตัวกลาง หรือ Intrinsic pathway (ปกป้อง ประยงค์ และคณะ 2007 ) และในปัจจุบันนี้การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น การดูจากภาพสัณฐานของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์ หรือการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในขบวนการตาย แบบอะพอพโทซิสด้วยเทคนิค Western blotting เป็นต้น

ซึ่งหนึ่งในสาเหตุการเกิดโรคอัลไซเมอร์จะเกิดจากการสะสมของเบต้าอะมัยลอยด์และภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะกระตุ้นการทำงานของ death signaling ทำให้เกิดการกระตุ้นผ่านไลแกนด จากนั้นก็มีกระตุ้นการทำงานของ caspase 8 (Clarke N and et al.2004) ทำให้ caspase- 8 เปลี่ยน bid .ให้เป็น t-bid จะไปกระตุ้น bax และ bak ทำให้ไมโทคอนเดรียเกิดการรั่วของ cytochrom C เมื่อ cytochrome C รั่วออกมาแล้วจะไปกระตุ้นการทำงานของ caspase- 9 และเมื่อ caspase- 9 ทำงานจะไปกระตุ้น caspase- 3 เมื่อ caspase- 3 ทำงานทำให้เกิดการกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสในที่สุดการควบคุมการเกิดอะพอพโทซิสเป็นสิ่งที่สำคัญในการรักษาโรคอัลไซเมอร์เนื่องจากเมื่อเกิดการชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิน้อยลงก็จะเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ ซึ่งโปรตีนที่ใช้ในการควบคุมการเกิดอะพอพโทซิสได้แก่ Bcl-xl, Mcl-1 และ survivin เป็นต้น (Lev N., Melamed E., and Offen D. 2003.)

### ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อการแสดงออกของ Bcl-2 family และ survivin

โปรตีน Bcl-2 family จะมีโครงสร้างหน่วยย่อย (domain regions) ร่วมกันในส่วน BH1-4 (Bcl-2 homology) และส่วน N-terminal transmembrane region ของ Bcl-2 proteins ซึ่งโปรตีน Bcl-

2 family จะมีหน้าที่ในการควบคุมวิถีอะพอพโทซิสในไมโทคอนเดรียซึ่งจะถูกเคลื่อนย้ายไปยังส่วนของเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย เพื่อให้เกิดการรักษาความคงตัวของ (mitochondrial integrity) และเพื่อควบคุม การหลั่งของ cytochrome C จากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโตซอล และในปัจจุบัน โปรตีน Bcl-2 family ถูกค้นพบมากกว่า 20 ชนิด ซึ่งสามารถแบ่งแยกตามโครงสร้างและหน้าที่ เป็น 3 ชนิดย่อย คือ 1. anti-apoptotic fraction: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, A1, Mcl-1 และ Boo 2. pro-apoptotic Bax/Bak-like group: Bax, Bok, Bcl-XS, Bak และ Bcl-GL 3. pro-apoptotic BH-3 only proteins: Bad, Bik, Bid, Hrk, Bim, Bmf, Noxa และ Puma (Hu W., and Kavanagh JJ. 2003) นอกจากนี้ยังมี anti-apoptosis อีกตัวคือ survivin จะทำหน้าที่ในการควบคุม caspase -9 ไม่ให้ไปกระตุ้นการทำงานของ caspase3 ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ anti-apoptotic 3 ตัวคือ Bcl-XL Mcl-1 และ Survivin จากการวิเคราะห์ผลการศึกษาระบบการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล DI และ PBS ที่ความเข้มข้น 1,10,100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มการแสดงออกของ Bcl-XL ,Mcl-1 และ Survivin ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ในสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล (Ethanol) ไม่พบการเพิ่มขึ้นของโปรตีน Survivin เนื่องจากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับระบบการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสารจากจิ้งหรีดสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผ่านกลไก anti-apoptotic fraction คือ Bcl-XL และ Mcl-1

### ผลของสารสกัดจากจิ้งหรีดต่อการทำงานของเอนไซม์ Caspase-3

เอนไซม์ caspase-3, เป็นโปรตีนมีหน้าที่เรียกว่า death substrates ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านกลไกการรอดชีวิต ด้วยการย่อยสลายโครงสร้างของโปรตีนอันได้แก่ actin, fodrin และ lamin ซึ่งมีส่วนกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแยกตัวและนิวเคลียสหดตัว และกระตุ้นการทำงานของ caspase-activated DNase / DNA fragmentation factor (CAD / DFF) ทำให้เกิดการแตกหักของ DNA หรือ DNA fragmentation โดยจะเกิดกลการสลายของเอ็นไซม์ poly (ADP - ribose) polymerase (PARP) ซึ่งมีหน้าที่ในการช่วยซ่อมแซมดีเอ็นเอ และทำลาย caspase-activated DNase inhibitor (ICAD) เอ็นไซม์กลุ่มนี้ ยังสามารถย่อยโปรตีนในวัฏจักรเซลล์ทำให้การแบ่งตัว ของเซลล์หยุดชะงัก (Gupta S. 2003) caspases ถูกสร้างอยู่ในรูป proenzyme (pro-caspases) ซึ่งจะยังไม่สามารถทำงานได้ โดยจะทำงานได้ต้องตัดย่อย (cleavage) (Cohen GM. 1997) จะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะ เช่น procaspase-3 ซึ่งจะนำไปสู่กระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสในที่สุด จากการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาระบบการตายของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเบต้าอะมัยลอยด์พบว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล DI และ PBS ที่ความเข้มข้น 1,10,100

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลดการตัดของ caspases 3 ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ในการทดลองที่ถูกกระตุ้นการตายของเซลล์ประสาทด้วยเบต้าอะมัยลอยด์ พบว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการตัดของ caspases 3 ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มของเบต้าอะมัยลอยด์ จากการการศึกษากระบวนการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเบต้าอะมัยลอยด์ เนื่องจากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบการศึกษากระบวนการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเบต้าอะมัยลอยด์ แต่จากผลการทดลองสารสรุปได้ว่า สารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอล DI และ PBS ที่ความเข้มข้น 1,10,100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการตัดของ caspases 3 จึงทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทย่นลง และสอดคล้องกับการผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทโดยผ่านกลไกการลดการตัดของ caspases 3 จึงทำให้ไม่เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส

#### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของจิ้งหรีดที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์จากจิ้งหรีดพันธุ์ทองคำ 3 กลุ่ม ได้แก่ สารสกัดจิ้งหรีดด้วยเอทานอล สารสกัดจิ้งหรีดด้วย DI และสารสกัดจิ้งหรีดด้วย PBS ต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ โดยได้ทำการศึกษา ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์การต้านการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งในหลอดทดลอง (*in vitro*) ได้ทำการศึกษการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรส การต้านการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์ และการต้านออกซิเดชัน ในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันโดยมีไฮโดรเจนเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะออกซิเดชันในเซลล์ ศึกษาการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเบต้าอะมัยลอยด์ และการศึกษากระบวนการตายของเซลล์ประสาท Western blotting analysis เพื่อทราบกระบวนการป้องกันการตายของเซลล์ จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วย DI มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด และสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด การศึกษาการต้านการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์ พบว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่มมีความสามารถในการต้านการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์ได้ เริ่มที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากจิ้งหรีดแสดงฤทธิ์การต้านการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะมัยลอยด์ได้ดีที่สุด แต่ไม่พบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสติลโคลีนเอสเทอเรส ของสารสกัดจากจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่ม จิ้งหรีดมีความสามารถในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว

และเมื่อนำสารสกัดจากจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่มมาเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดที่สกัดด้วยน้ำ (DI) ให้ผลการป้องกันการตายของเซลล์ได้ดีที่สุด นอกจากนั้นยังพบว่าจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่ม สามารถลดอัตราการตายของเซลล์ประสาท SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย เบต้าอะไมลอยด์และเมื่อนำสารสกัดจากจิ้งหรีดมาศึกษากระบวนการตายของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการตายโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเบต้าอะไมลอยด์ พบว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดทั้ง 3 กลุ่มนี้ช่วยลดการเติมฟอสเฟตให้โปรตีนที่กระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิส ได้แก่ JNK, Akt และ P38 ทำให้ไม่เกิดการ ทำงานของ caspase 3 จึงไม่เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส นอกจากนั้นยังช่วยกระตุ้น anti-apoptotic protein ได้แก่ Mcl-1, Bcl-xl และ survivin

จากการวิจัยในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำมีฤทธิ์ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้หลายหลายกลไก ได้แก่ ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์การต้านการเกาะกลุ่มกันของเบต้าอะไมลอยด์ ฤทธิ์การป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเบต้าอะไมลอยด์ น่าจะมีศักยภาพที่ดีในการป้องกันและรักษาโรคอัลไซเมอร์

ผลของการศึกษามีประโยชน์ในการใช้ต่อยอดเพื่อพัฒนาเป็นอาหารเสริมหรือยาที่ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคอัลไซเมอร์ นอกจากนั้นยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของจิ้งหรีด และส่งเสริมให้เกษตรกรมีรายได้จากการเพาะเลี้ยงจิ้งหรีด

เอกสารอ้างอิง

## เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ. “รอบรู้เศรษฐกิจ ตามติดตลาดโลก”, หนังสือพิมพ์ประชาชาติธุรกิจ. ปีที่ 39(ฉบับที่ 4886) : 7 - 9 พฤศจิกายน 2559, หน้า 5
- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2546). “คู่มือเจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตรหลักสูตรการเลี้ยงจิ้งหรีด”, การเลี้ยงจิ้งหรีด. <http://kasetonline.com>. 30 พฤศจิกายน, 61.
- ทัศนีย์ แจมจรรยา ชาญชัย ถาวรอนุกุลกิจ และ วิโรจน์ชลิสสุวรรณ. “การเลี้ยงจิ้งหรีดในเชิงอุตสาหกรรม”, ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 32(1): 95-98; 2534.
- นันทยา จงใจเทศ และคณะ. (2549). “คุณภาพโปรตีนและไขมันในแมลงที่กินได้”, <http://nutrition.anamai.moph.go.th/temp/main/viwe.php>. 5 พฤษภาคม, 2018.
- บุญทิศา วาฑิรยธัมย์. “แมลงกระป๋อง”, ว. กีฏ.สัตว์. 23(1): 61-62, 2544.
- ปวีณา นพโสธร และ รังสิมันต์ สุนทรไชยา. “ผลของ โปรแกรมเสริมสร้างความหวังแบบครอบครัวมีส่วนร่วม ต่อภาวะซึมเศร้าของผู้ป่วยโรคซึมเศร้าวัยสูงอายุ”, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2534”, 32(1): 95-98, 2558.
- ยุพา หาญบุญทรง และคณะ. “การสำรวจแมลงกินได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ”, แก่นเกษตร. 29(1): 35-44; 2544.
- สถาบันประสาทวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางเวชปฏิบัติภาวะสมองเสื่อม. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข., 2551.
- สุภาพรรณ เขี่ยมชัยภูมิ. “แปดกินได้ อร่อยอย่างไม่น่าเชื่อ”, ครีว. 8(90): 61-79, 2544.
- อัญชลี ชุมทอง. “Alzheimer's disease : Silent danger in elderly”, วารสารวิชาการสาธารณสุข. 17(6): 1019-1030; พฤศจิกายน-ธันวาคม, 2551.
- Ahn M. and et al. “Effects of cricket supplementson the chicken meats and its eggs”, Korean J.Poult. Sci. 27(1): 97–202, 2000.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Ahn M.Y, Y. and et al. “Protective effects of water/methanol extracts of cricket on the acute hepatic damages in the ICR-mice induced by administration of CCl<sub>4</sub>”, **Korean J. Food Sci.** 34(4): 684- 687, 2002.
- Aline Augusti Boligon , Michel Mansur Machado and Margareth Linde Athayde Boligon. “Technical Evaluation of Antioxidant Activity”, **Medicinal Chemistry.** 4(7): 517-522, 2014.
- Alzheimer’s Association. “Alzheimer’s disease facts and figures. Alzheimer’s”, **Alzheimer's & Dementia.** 15(6): 158-194; March, 2010.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993) “Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging”, **Proceedings of the National Academy of Sciences.** <https://www.pnas.org/content/90/17/7915.abstract>. July 15, 2018.
- Anony mous. (2005) “Basics of Alzheimer’s Disease: What It Is and What You Can Do. Chicago IL: Alzheimer’s”, **Association.** [https://www.alz.org/national/documents/brochure\\_basicsofalz\\_low.pdf](https://www.alz.org/national/documents/brochure_basicsofalz_low.pdf) June 9, 2018.
- Arnao M.B, Cano,A and Acosta,M “the hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity”, **Food chemistry.** 73(2): 239-244; May, 2001.
- Asma Nisar. and et al. “Identification of Flavonoids (Quercetin, Gallic acid and Rutin) from Catharanthus Roseus Plant Parts using Deep Eutectic Solvent”, **Recent Advances in Biology and Medicine.** (3): 1-6; February 5, 2017.
- Aydemir, B. and rt al. “The influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men”, **J. Androl.** 29: 41–46; January 2, 2008.
- Bancher C. and et al. “Accumulation of abnormally phosphorylated x precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease”, **Brain Res.** 477(1–2): 90–99; January 16, 1980.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Bartus RT. “On neurodegenerative diseases, models and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis”, **Exp Neurol.** 163: 495-529; Jun, 2000.
- Bondet V, Brand-Williams W and Berset C. “Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method”, **Food Sci Technol.** 30: 609-615; September, 1995.
- Bonpong. (2009). “Acetylcholine ”, **Acetylcholine.**  
<http://www.sahavicha.com/?name=knowledge&file=readknowledge&id=1398>. November 15, 2018
- Bourdel-Marchasson I, Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E. “Antioxidant defence and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients”, **Age Ageing.** 30(3): 235-41; May, 2001.
- Cellarier E. and et al. “Methionine dependency and cancer treatment”, **Cancer Treatment Reviews.** 29(6): 489–99; Decsember, 2003.
- Chiarugi A, Moskowitz MA. “PARP-1—a perpetrator of apoptotic cell death?”, **Science.** 297(5579): 259–63; July 12, 2002.
- Chien-Li Chen, Wen-Hao Tsai, Chun-Jen Chen and Tzu-Ming Pan. “Centella asiatica extract protects against amyloid  $\beta_{1-40}$ -induced neurotoxicity in neuronal cells by activating the antioxidative defence system”, **Journal of Traditional and Complementary Medicine.** 6(4): 362-369; October, 2016.
- Clarke N. and et al “Retinoids: potential in cancer prevention and therapy”, **Expert Retrieved in molecular medicine.** 6(25): 1-23; November 30, 2004.
- Cohen GM. “Caspase: the executioners of apoptosis”, **Biochem J.** 326(1): 1-16; August, 1997.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Cohen, Z., Reungjitchawali, M., Siangdung, W., and Tanticharoen, M. “Production And partial purification of gamma – linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*”, **Journal of Applied Phycology**. 5(1): 109 – 115; February, 1993.
- Cui Z. and et al. (2002) “*Materia medica from insect*”, **Korea Shinilbooks**.  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03670244.1997.9991516?journalCode=gefn20>. May 25, 2018.
- DeCarli C. “Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment”, **Lancet Neurol**. 2(1): 15-21; January, 2003.
- Di Santo SG. and et al. “A meta-analysis of the efficacy of donepezil, rivastigmine, galantamine, and memantine in relation to severity of Alzheimer's disease”, **Journal of Alzheimer's Disease**. 35(2):349-61; January 23, 2013.
- Doaa M Samy. and et al. “Downstream modulation of extrinsic apoptotic pathway in streptozotocin-induced Alzheimer's dementia in rats: Erythropoietin versus curcumin”, **European Journal of Pharmacology**. 770: 52–60; January 5, 2016
- Dong-Hwan. and et al. “Immune-Enhancing Activity Screening on Extracts from Two Crickets, *Gryllus bimaculatus* and *Teleogryllus emma*”, **Entomological Research**. 34: 207-211, 2004.
- Ellman, G. L. and et al. “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity”, **Biochemical Pharmacology**. 7(2): 88–95; July, 1961.
- Farlow MR. and et al. “A. Efficacy of rivastigmine in Alzheimer's disease patients with rapid disease progression: results of a meta-analysis”, **Dement Geriatr Cogn Disord**. (20):192-197; March 7, 2005.
- Farrimond LE, Roberts E and McShane R. “Memantine and cholinesterase inhibitor combination therapy for Alzheimer's disease: a systematic review”, **BMJ Open**. 2(3): 1-8; June, 2012.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Feldberg W and Lin RCY. "Synthesis of acetylcholine in the wall of the digestive tract", **Journal of Physiology**. 111(1-2): 96-118; April, 1950.
- Ferri CP. And et al. "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study", **The Lancet**. 366(9503): 2112-2117; December 17, 2005.
- Floyd RA, Hensley K. "Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases", **Neurobiology of Aging**. 23(5): 795-807; September–October, 2002.
- Francis, P. T. and et al. "The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress", **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**. 66(2): 137–147; February, 1999.
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death, Collaborators. "Global, regional, and national age sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013", **Lancet**. 385(9963): 117-171; December 17, 2015
- Goedert, M., Spillantini, M. G., & Crowther, R. A. "Tau Proteins and Neurofibrillary Degeneration", **Brain Pathology**. 1(4): 279–286; July, 1991.
- Gotz J and Ittner LM. "Animal models of Alzheimer's disease and from to temporal dementia", **Nature Reviews Neuroscience**. 9(7): 532-544; July, 2008.
- Grossberg G. and et al. "Efficacy of higher dose 13.3 mg/24 h rivastigmine patch on instrumental activities of daily living in patients with mild to moderate Alzheimer's disease", **American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias**. (28): 583-591; August 27, 2013.
- Grundke-Iqbal I. and et al. (1986) "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology", **Proceedings of the National academy of sciences**.  
<https://www.pnas.org/content/83/13/4913.short>. July 1, 2018.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Gupta S. “Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis”, **International Journal of Oncology**. 22(1): 15-20; January 1, 2003.
- Haass C, De Strooper B. “The presenilins in Alzheimer’s disease-proteolysis holds the key”, **Science**. 286(5441): 916-919; October 29, 1999.
- Hardy, J., & Allsop, D. “Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer’s disease”, **Trends in Pharmacological Sciences**. 12: 383–388, 1991.
- Helbert LE, Beckett LA and Scherr PA. “Annual projected to the years 2000 through 2050”, **Alzheimer Disease and Associated Disorders**. 15(4): 169-73; October, 2001.
- Hoyert DL, Kung HC, and Smith BL. “Deaths: preliminary data for 2003”, **National Vital Statistics Reports**. 53(15): 1-6; February 28, 2005
- Hu W., and Kavanagh JJ. “Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway”, **The Lancet Oncology**. 4(12):721-729; December, 2003
- José Luna-Muñoz. and et al. (2013) “Phosphorylation of Tau Protein Associated as a Protective Mechanism in the Presence of Toxic, C-Terminally Truncated Tau in Alzheimer's Disease”, **Alzheimer's Disease**.  
<https://www.intechopen.com/books>. March 27, 2018
- Kokatnur MG. and et al. “Fatty acid composition of human adipose tissue from two anatomical sites in a biracial community”, **The American Journal of Clinical Nutrition**. 32(11): 2198–205; November, 1979.
- Kondoh T and Torii K. “MSG Intake Suppresses Weight Gain, Fat Deposition, and Plasma Leptin Levels in Male Sprague–Dawley Rats”, **Physiology & Behaviour**. 95(1-2): 135-144; September 3, 2008.
- Larson E B, Yaffe K and Langa K. M. “New Insights into the Dementia Epidemic”, **The New England Journal of Medicine**. 369: 2275-2277; December 12, 2013.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Lee Y.W. and et al. “Effect of water and methanol extracts of cricket (*Gryllus bimaculatus*) on alcohol metabolism”, **Korean J. Pharmacogn.** 35(2): 175-178; June, 2004.
- Lee, J.M., and B.K. Son. “Effects of chitosan of different molecular weights in lipid metabolism in rats”, **Food & Nutrition Science Regular Papers.** 31(2): 143-152, 1998.
- Leung HW, Kuo CL, Yang WH, Lin CHLH. “Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis”, **European Journal of Pharmacology.** 543(1-3): 12-18; March 18, 2006.
- Lev N., Melamed E., and Offen D. “Apoptosis and Parkinson’s disease”, **The Journal of the American College of Nutrition** 27(2): 245– 250; April, 2003.
- LeVine, H. “Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer’s disease  $\beta$  amyloid aggregation in solution”, **Protein science.** 2(3): 404-410; March, 1993
- Lieber CS. “Alcohol, liver, and nutrition”, **The Journal of the American College of Nutrition.** 10(6): 602-632; December, 1991.
- Lieber CS. “Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease”, **Alcohol Research & Health.** 27(3): 220-31, 2003.
- Liu CK, Tai CT and Lin RT. “Epidemiology of dementia in Taiwan”, **Journal Of Applied Psychology.** 7: 157-69; September, 2000.
- Liu Y. and et al. “IKKb deficiency in myeloid cells ameliorates Alzheimer’s disease-related symptoms and pathology”, **Journal of Neuroscience.** 34(39): 12982–12999; September 24, 2014.
- Lott IT and Head E. “Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis”, **Neurobiol Aging.** 26(3): 383-389; March, 2005.
- Luelak Lomlim and Teerapat Nualnoi. “New Approach in Development of Acetylcholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer’s Disease”, **Thai Pharmaceutical and Health Science Journal.** 6(2): 157-173; January, 2011.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G. and Garg, M. L. “Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review”, **Science of Food Agriculture**. 86: 2046–2056, 2006.
- Mark P. Mattson. “Pathways towards and away from Alzheimer's disease”, **Nature**. 430: 631–639; August 5, 2004.
- Massoud F and Gauthier S. “Update on the pharmacological treatment of Alzheimer's disease”, **Curr Neuroparmacol**. 8: 69-80, 2010.
- Mattson, Mark P., Calabrese, Edward J. (2010) “A Revolution in Biology, Toxicology and Medicine”, **Toxicity**. <https://www.springer.com/us/book>. September 20, 2018
- Mi Young Ahn. . and et al. “Anti-aging Effect and Gene Expression Profiling of Aged Rats Treated with *G. bimaculatus*”, **Toxicological Research**. 31(2): 173-180, 2015.
- Moon, J. K.; Shibamoto, T. “Antioxidant assays for plant and food components”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57(5): 1655–1666, 2009.
- Mosaad and Y.M. “Hematopoietic stem cells, an overview. Tansfus. Apher”, **Science**. 51: 68-82, 2014.
- Nakabeppu, Y. and et al. “Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids”, **Journal of Biological Chemistry**. 387(4): 373-382; April 11, 2006.
- Norhidayah Mohd Taufek. and et al. “The effect of dietary cricket meal (*Gryllus bimaculatus*) on growth performance, antioxidant enzyme activities, and haematological response of African catfish (*Clarias gariepinus*)”, **Fish Physiology Biochemistry**. 42(4): 1143-1155; August, 2016.
- Oh MH. and et al. “Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity”, **Phytomedicine**. 11(6): 544-8; September 20, 2004.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Ohnishi, S., & Takano, K. “Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding”, **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**. 61(5), 511–524; March, 2004.
- Oliver E. and et al. “Roche. The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA”, **Proceedings of the Nutrition Society**. 69(2): 232-243; May, 2010.
- Pratico D, Uryu K, Leight S. “Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis”, **Journal of Neuroscience**. 21(12): 4183-4187; June 15, 2001.
- Park SY. and et al. “Curcumin protected PC12cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation”, **Food and Chemical Toxicology**. 46(8): 2881–2887; August, 2008.
- Querfurth HW and LaFerla FM. “Alzheimer’s disease”, **N Engl J Med**. 362(4): 623 – 629, 2010.
- Schallreuter KU. and et al. “In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase” **Journal of Investigative Dermatology Symposium**. 4(1): 91-96; September, 1999
- Selkoe DJ. “Defining molecular targets to prevent Alzheimer disease”, **Neurological Review**. 62(2): 192-195, 2005.
- Sharma R, Chaturvedi C and Tewari PV. “Efficacy of *Bacopa monnieri* in revitalizing intellectual functions in children”, **Indian Journal of Medical Research**. 6: 1-10, 1987.
- Small SA, Duff K. “Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer’s disease: a dual pathway hypothesis”, **Neuron**. 60(4): 534-542; November 26, 2008.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Somin Lee<sup>1,2</sup>, Kyu Sup Ahn, Hyeon Yeol Ryu, Hye Jin Kim and Jin Kyu Lee. “Safety evaluation of cricket (*Gryllus bimaculatus*) extract in Sprague-Dawley rats”, **Int. J. Indust. Entomol.** 32(1): 12-25; March, 2016.
- Soto C. and et al. “Inhibition of alzheimer’s amyloidosis by peptides that prevent  $\beta$ -sheet conformation”, **Biochemical and biophysical research communications.** 226(3): 672-680; September 24, 1996.
- Soto C. and et al. “Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer’s disease”, **Molecular Medicine.** 5(8): 343-350; August 1, 1999
- Sun X. and et al. “Review of drugs for Alzheimer’s disease”, **Drug Discoveries & Therapeutics.** 6(6): 285-90, 2012.
- Tanzi RE and Bertram L. “Twenty years of the Alzheimer’s disease amyloid hypothesis: a genetic perspective”, **Cell.** 120(4): 545-555; February 25, 2005.
- Teixeira, j. and et al. “ Exploring nature profits: development of novel and potent lipophilic antioxidants based on galloyl—cinnamic hybrids,” **European Journal of Medicinal Chemistry.** 62: 289–296; April, 2013.
- Tjernberg. and et al. “Arrest of amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand”, **Journal Biological Chemistry.** 271(15): 8545-8548, 1996.
- Valko, M. and et al. “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, **International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 39(1): 44-84, 2007.
- Waiwut P. and et al. “Gomisin N enhances TNF- $\alpha$ -induced apoptosis via inhibition of the NF-kB and EGFR survival pathways”, **Molecular and Cellular Biochemistry.** 350(1-2): 169–175; April, 2011.
- Walsh DM and Selkoe DJ. “Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer’s disease”, **Neuron.** 44(1): 181–93; September 30, 2004.
- Wilkinson DG. and et al. “Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer’s disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy”, **Drugs Aging.** 21(7): 453-478; June, 2004.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Xu Liu. and et al. “Long-term treatment with Ginkgo biloba extract EGb 761 improves symptoms and pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease”, **Brain, Behavior and Immunity**. 46: 121–131; May, 2015.
- Yamaguchi S and Takahashi C. “Interactions of monosodium glutamate and sodiumchloride on saltiness and palatability of a clear soup”, **Journal of Food Science**. 49(1): 82–85,1984
- Yan and L.J. “Positive oxidative stress in aging and aging related disease tolerance”, **Redox Biol**. 2: 165-169, 2014

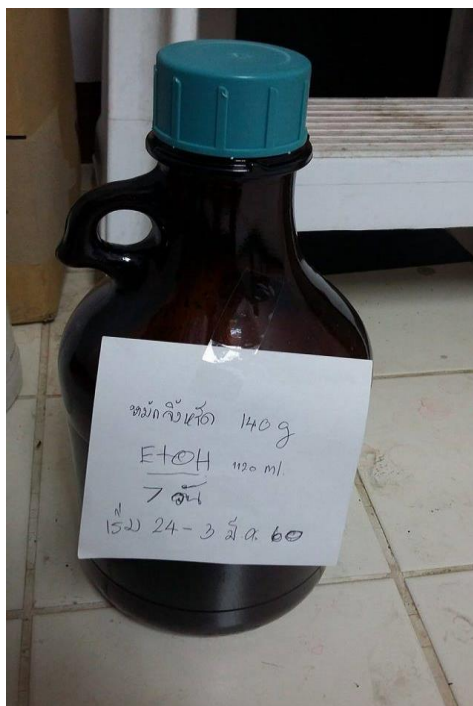
ภาคผนวก



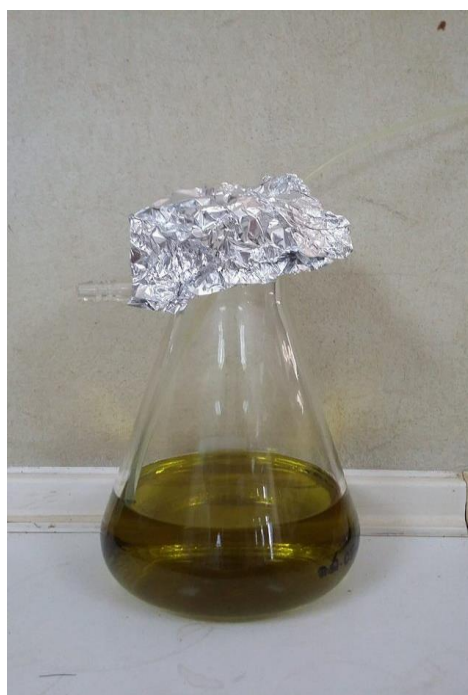
ภาพที่ ก.1 การนำจิ้งหรีดมาล้างทำความสะอาดก่อนนำไปอบ



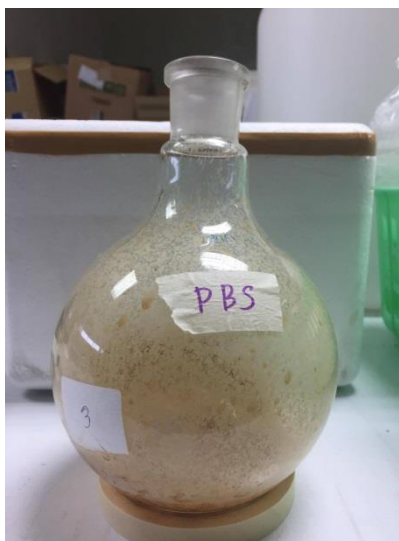
ภาพที่ ก.2 Evaporator ของสารสกัดจิ้งหรีด



ภาพที่ ก.3 การหมักจิ้งหรีดด้วยเอทานอล



ภาพที่ ก.4 การกรองเอากากของจิ้งหรีดออก



ภาพที่ ก.5 Freeze-dried ของสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย PBS



ภาพที่ ก.6 Freeze-dried ของสารสกัดจิ้งหรีดที่สกัดด้วย DI

## ประวัติผู้วิจัย

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อ – ชื่อสกุล     | นางสาวพัชรภรณ์ บุญศิลป์                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| วัน เดือน ปีเกิด    | 30 พฤศจิกายน 2536                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| สถานที่เกิด         | จังหวัดอุบลราชธานี                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| สถานที่อยู่ปัจจุบัน | 129 หมู่ที่ 1 ตำบลเชียงใน อำเภอลืออำนาจ จังหวัดอุบลราชธานี<br>รหัสไปรษณีย์ 34150                                                                                                                                                                                                                                                      |
| ประวัติการศึกษา     | พ.ศ. 2559 หลักสูตรแพทย์แผนไทยบัณฑิต สาขาการแพทย์แผนไทยและ<br>แพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี<br>พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนเชียงในพิทยฯ จังหวัดอุบลราชธานี<br>พ.ศ. 2552 มัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนเชียงในพิทยฯ จังหวัดอุบลราชธานี<br>พ.ศ. 2551 ประถมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนเชียงในเจริญราษฎร์<br>จังหวัดอุบลราชธานี |

