



การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการปกป้องเซลล์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่าย
อาร์โธรสไปร่าพลาเทนิซิสในเซลล์กล้ามเนื้อหนู



นายยา วงศ์ใหญ่

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการปกป้องเซลล์ของโปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่าย
อาร์โธรสไปร่าพลาเทนิซิสในเซลล์กล้ามเนื้อหนู



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการปกป้องเซลล์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก
สำหรับยารักษาโรคไปร่าพลาเทนิสในเซลล์กล้ามเนื้อ"

ของ นาดยา วงศ์ใหญ่

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ตามรัศมน สุราษฎร์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธารทิพย์ บุญส่ง)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการปกป้องเซลล์ของโปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่ายอาร์โทรสไปราพลาเทนซิสในเซลล์กล้ามเนื้อหนู
ผู้วิจัย	นาตยา วงศ์ใหญ่
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อำนาจ เพชรรุ่งนภา
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ตามรัศมณ สุรางกูร
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2563
คำสำคัญ	Sarcopenia, Antioxidant, Protein hydrolysate, <i>Arthrospira platensis</i>

บทคัดย่อ

ภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลง หรือ sarcopenia เป็นภาวะที่พบมากในผู้สูงอายุซึ่งมีปัจจัยสำคัญคือ การสลายโปรตีนกล้ามเนื้อที่เพิ่มขึ้นและการสะสม reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์ ดังนั้นการลดอัตราการสลายโปรตีนในเซลล์กล้ามเนื้อและป้องกันการสะสมของ ROS จึงมีความสำคัญสำหรับการป้องกันภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสที่ผลิตจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* (A. platensis protein hydrolysate หรือ APH) ในการต้านอนุมูลอิสระ การปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระ และการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีนในเซลล์กล้ามเนื้อ L6 ผลการศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay พบว่า APH มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงถึง $90.10 \pm 0.53\%$ scavenging ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ และยังพบว่า APH สามารถป้องกันและฟื้นฟูเซลล์ L6 จากความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก H_2O_2 ได้ เมื่อทำการทดสอบการลดการสะสมของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ด้วยวิธี Dichloro-dihydro-fluorescein Diacetate (DCFH-DA) Assay พบว่าปริมาณของ ROS ที่สะสมในเซลล์ L6 ที่ได้รับ APH ร่วมกับ H_2O_2 ทั้งในรูปแบบของ co-treatment และ protection ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 และผู้วิจัยยังพบอีกว่า APH สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ glutathione peroxidase ได้ นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบว่า APH มีคุณสมบัติในการลดการแสดงออกของยีน MuRF1 และ Atrogin-1 ในเซลล์ L6 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีนในเซลล์กล้ามเนื้อได้อย่างมีนัยยะสำคัญ จากผลการศึกษาที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่า APH มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการสะสมของ ROS ภายในเซลล์ และยังสามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีนในเซลล์กล้ามเนื้อได้อีกด้วย ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนา

APH เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อป้องกันภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงต่อไป



Title	ANTIOXIDANT AND CYTOPROTECTIVE EFFECT OF <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> PROTEIN HYDROLYSATE IN RAT SKELETALMUSCLE CELLS
Author	NATTAYA WONGYAI
Advisor	Assistant Professor Amnat Phetrungnapha, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Damratsamon Surangkul, Ph.D.
Academic Paper	Thesis M.S. in Biochemistry, Naresuan University, 2020
Keywords	Sarcopenia, Antioxidant, Protein hydrolysate, <i>Arthrospira platensis</i>

ABSTRACT

Muscle aging is a complex process that is usually associated with a decrease in muscle mass, strength, and velocity of contraction. One of the most striking effects of muscle aging is known as sarcopenia, a condition characterized by loss of skeletal muscle mass and function. Increased of muscle protein degradation and the accumulation of the reactive oxygen species (ROS) is an important factors leading to decrease of muscle mass. Therefore, reduction of muscle protein degradation and prevention of ROS is crucial for protection of muscle mass loss. This research aims to study the antioxidant and cytoprotective effect of protein hydrolysate produced from blue-green algae, *Arthrospira platensis* (APH). The antioxidant activity of *A. platensis* protein hydrolysate (APH) was determined by using ABTS assay. The result showed that APH exhibited $90.10 \pm 0.53\%$ scavenging activity at the concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$. Further study in L6 rat skeletal muscle cells indicated that APH could protect and recover the cells from H_2O_2 -induced oxidative stress. The accumulation of ROS in L6 cells were determined by using the DCFH-DA assay. The result showed the ROS accumulation in the L6 cells treated with APH both co-treatment and protection experiments was significantly lower than those treated with H_2O_2 only. In addition, we also found that APH could stimulate the expression of antioxidant gene, glutathione peroxidase. The effect of APH on the expression of genes involved in muscle wasting , MuRF1 and Atrogin-1 was also

studied. The result showed that APH could significantly reduce the expression of MuRF1 and Atrogin-1 in L6 cells when compared to the L6 cells treated with dexamethasone only. Taken together, this research demonstrated that APH exhibits the antioxidant and cytoprotective activity, and could reduce the expression of muscle wasting-related genes. The results obtained from this research will be useful for developing APH as a dietary supplement for prevention of Sarcopenia.



ประกาศคุณูปการ

การทำวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีนั้น ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คอยชี้แนะในเรื่องต่างๆ รวมถึงให้คำปรึกษาตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ

ผศ.ดร.ตามรัศมน สุรางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิจัย ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธารทิพย์ บุญส่ง กรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในและ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลามาให้คำแนะนำแนวทางการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย รวมทั้งเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานประสานงานโครงการวิจัยการพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานความหลากหลายทางชีวภาพ (BEDO) ขอขอบคุณสมาชิก AP lab ทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ บัณฑิตศึกษา ภาควิชาชีวเคมีที่คอยให้คำแนะนำและอยู่เป็นเพื่อนร่วมทุกข์ร่วมสุขตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุน เป็นทั้งแรงกายแรงใจในการศึกษาเล่าเรียน เป็นทุกสิ่งทุกอย่างและเป็นส่วนสำคัญที่สุดที่ทำให้มีกำลังใจในการทำวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณตัวผู้วิจัยเองที่อดทนและตั้งใจในการศึกษาเล่าเรียนจนบรรลุถึงความสำเร็จ

นัตยา วงศ์ใหญ่

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุุณูปการ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	๗
สารบัญภาพ	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
ระบบกล้ามเนื้อ (Muscular system).....	6
ชนิดของกล้ามเนื้อ (Types of muscle).....	6
กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle).....	6
กล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac muscle).....	7
กล้ามเนื้อลาย (Striated muscle).....	8
การพัฒนาของระบบกล้ามเนื้อ (Development of the muscular system).....	9
การเจริญของกล้ามเนื้อลาย.....	9
การเจริญของกล้ามเนื้อเรียบ.....	11
การเจริญของกล้ามเนื้อหัวใจ.....	11
อนุมูลอิสระ (Free radical).....	11

ความชราของกล้ามเนื้อและภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลง (Muscle aging and Sarcopenia)	13
การสลายตัวของกล้ามเนื้อ (Muscle degradation)	17
บทบาทของ Glucocorticoids ในการเกิดการสลายตัวของโปรตีนกล้ามเนื้อ (Muscle degradation)	19
โปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysate)	21
วิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysate)	22
กระบวนการทางเคมี (Chemical Hydrolysis Process)	22
การใช้จุลินทรีย์ในการผลิต (Microbial Fermentation)	22
กระบวนการทางเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)	22
ประโยชน์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทและไบโอแอคทีฟเปปไทด์ (Bioactive peptides)	23
<i>Arthrospira platensis</i>	24
L6 skeletal muscle cell	27
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	28
ชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย	28
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	28
วิธีดำเนินงานวิจัย	32
การเพาะเลี้ยงสาหร่าย <i>A. platensis</i>	32
สกัดโปรตีนจากสาหร่าย <i>A. platensis</i>	33
การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย <i>A. platensis</i>	33
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย <i>A. platensis</i> ด้วยวิธี ABTS assay	33

การเพาะเลี้ยงและการ Differentiation ของ L6 Rat skeletal muscle cell.....	34
การศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของ hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) ใน L6 Rat skeletal muscle cell.....	34
การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสเทในการลดระดับการสะสมของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ด้วยวิธี DCFH-DA assay	35
การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสเทในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle	36
การศึกษาผลของโปรตีนไฮโดรไลสเทต่อการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ในสถานะที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน.....	36
การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสเทในการลดระดับการแสดงออกของยีน Muscle atrophy F-box (<i>Atrogin-1</i>) และ Muscle ring finger 1 (<i>MuRF1</i>) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle	37
วิธีการสกัด RNA ของเซลล์ Rat L6 skeleton muscle cell (L6 cell)	38
ขั้นตอนการเตรียม cDNA.....	38
Polymerase chain reaction (PCR).....	39
วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล.....	41
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	42
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสเทจากสาหร่าย <i>Arthrospira platensis</i> ด้วยวิธี ABTS assay	42
คุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle cell ของโปรตีนไฮโดรไลสเทจากสาหร่าย <i>A. platensis</i>	43
ความเป็นพิษต่อเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ของ hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) (Unpublished data, Sirikan Pongnan)	43

ความเป็นพิษต่อเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก สาหร่าย <i>A. platensis</i>	44
การทดสอบคุณสมบัติในป้องกันเซลล์จาก H ₂ O ₂ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle	45
การทดสอบคุณสมบัติในการลดความเป็นพิษ H ₂ O ₂ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle	48
คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก <i>A. platensis</i> ในการลดระดับการสะสมอนุมูล อิสระภายในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ด้วยวิธี DCFH-DA assay	51
การทดสอบแบบ CO-treatment	51
การทดสอบแบบ Protection	52
คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก <i>A. platensis</i> ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน ในระบบต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle	53
คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้าน อนุมูลอิสระในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด ความเครียดออกซิเดชัน	54
การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตในการลดระดับการแสดงออกของยีน Muscle atrophy F-box (<i>Atogin-1</i>) และ Muscle ring finger 1 (<i>MuRF1</i>) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle	56
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	57
อภิปรายผล	57
การ Differentiation ของ L6 Rat skeletal muscle cell	58
จากการศึกษาผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ L6 ที่อยู่ในระยะ myoblast ใน complete medium ที่มี 10% FBS จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการ differentiation จากระยะ myoblast สู่ระยะ myotube โดยการลดความเข้มข้นของ FBS เป็น 2% ซึ่งการ differentiation	

ของเซลล์กล้ามเนื้อจากกระเพาะ myoblast สู่ระยะ myotube นั้น การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Jame และคณะได้อธิบายไว้ว่า มักจะถูกควบคุมโดยองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง หรือถูกควบคุมด้วย mitogens ซึ่งเป็นโมเลกุลของเปปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็กที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการแบ่งตัวและการพัฒนาของเซลล์กล้ามเนื้อ โดยพบว่า insulin-like growth factors (IGFs) ซึ่งเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนในกลุ่มของ mitogens ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการ differentiation ของ myoblast cell โดยผ่านการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ myogenin gene ซึ่งเป็น transcription factors ที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนา ซ่อมแซม และสร้างกล้ามเนื้อโครงร่าง โดยพบว่า IGFs นั้นมีการแสดงออกได้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี growth factors ซึ่งก็พบว่าเซลล์กล้ามเนื้อในระยะ myoblast เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของซีรัมที่ต่ำ จะส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของ IGF-II ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน ส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้นการ differentiation ของเซลล์กล้ามเนื้อ (Florini et al., 1991).....	58
ความเป็นพิษต่อเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ของโปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่าย <i>A. platensis</i>	58
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่าย <i>A. platensis</i> ด้วยวิธี ABTS.....	59
คุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle cell ของโปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่าย <i>A. platensis</i>	59
คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสจาก <i>A. platensis</i> ในการลดระดับการสะสมอนุมูลอิสระภายในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ด้วยวิธี DCFH-DA assay.....	60
คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน	63

การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสเทในการลดระดับการแสดงออกของยีน

Muscle atrophy F-box (*Atogin-1*) และ Muscle ring finger 1 (*MuRF1*) ในเซลล์ L6

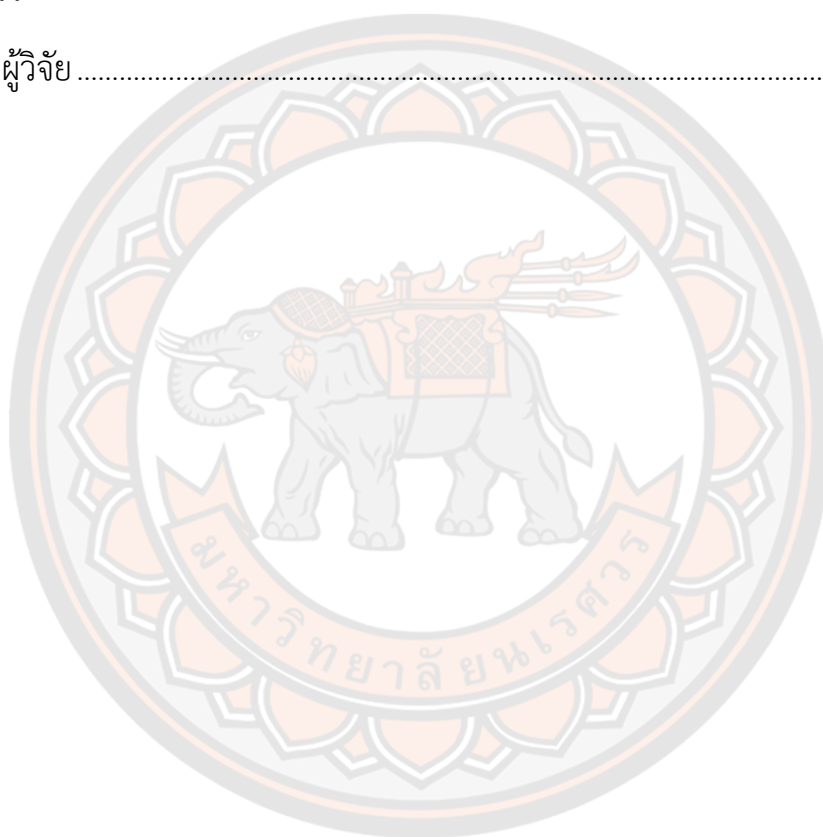
Rat skeletal muscle64

สรุปผลงานวิจัย.....66

บรรณานุกรม68

ภาคผนวก.....79

ประวัติผู้วิจัย83



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ตัวอย่างของ RS โดยแบ่งประเภทตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation และแบ่งย่อยโดยลักษณะของการ เป็น radical ของโมเลกุล ที่มา: (Lockwood, 2007).....	12
ตาราง 2 องค์ประกอบของสารถ่าย <i>A. platensis</i> (Pyne PK, 2017)	25
ตาราง 3 องค์ประกอบในสูตรอาหาร Zarrouk's medium (Greque de Morais, 2015).....	32
ตาราง 4 แสดงลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน SOD1, GPx1 และ CAT	37
ตาราง 5 แสดงลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>MuRF1</i> และ <i>Atrogin-1</i>	38
ตาราง 6 PCR reaction สำหรับ <i>SOD1</i> , <i>GPX1</i> , <i>CAT</i> , <i>Atrogin-1</i>	39
ตาราง 7 PCR reaction สำหรับ <i>MuRF1</i>	39
ตาราง 8 PCR condition สำหรับ <i>SOD1</i> , <i>GPX1</i> , <i>CAT</i> , <i>Atrogin-1</i> และ <i>MuRF1</i>	40
ตาราง 9 PCR reaction สำหรับ β -Actin.....	40
ตาราง 10 PCR condition สำหรับ β -Actin	41

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 Flow chart ขอบเขตการศึกษา	4
ภาพ 2 ลักษณะของกล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle).....	7
ภาพ 3 ลักษณะของกล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac muscle).....	8
ภาพ 4 ลักษณะของกล้ามเนื้อลาย (Striated Muscle muscle).....	9
ภาพ 5 การเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อลาย	10
ภาพ 6 การลดลงของมวลกล้ามเนื้อเมื่ออายุมากขึ้น.....	14
ภาพ 7 ผลของอายุใน signaling pathway ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนและ การ ย่อยสลายโปรตีน ที่มา: (M. J. Gomes et al., 2017).....	16
ภาพ 8 กระบวนการ electron transport chain ในไมโทคอนเดรีย	16
ภาพ 9 Muscle atrophy pathways	19
ภาพ 10 Glucocorticoids กระตุ้นการเกิด Muscle atrophy	21
ภาพ 11 การตัดของเอนไซม์ที่แตกต่างกันและให้โปรตีนไฮโดรไลสที่ต่างกัน ที่มา: (M. Nasri, 2017).....	23
ภาพ 12 ลักษณะรูปร่างของสาหร่าย <i>A. platensis</i>	24
ภาพ 13 L6 myoblast cell	27
ภาพ 14 การ differentiation จากเซลล์ L6 myoblast cell เป็น myotube cell.....	27
ภาพ 15 กราฟแสดงผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน ไฮโดรไลสจากสาหร่าย <i>A. platensis</i> ด้วยวิธี ABTS (Mean±SD)	42
ภาพ 16 การวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อได้รับ H ₂ O ₂ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ด้วย วิธี MTT assay (Unpublished data form Sirikan Pongnan).....	43

ภาพ 17 การวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อได้รับโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay (Mean±SD).....	44
ภาพ 18 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วย H ₂ O ₂ ความเข้มข้น 800 µM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Mean±SD)	46
ภาพ 19 คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสจาก <i>A. platensis</i> ในการป้องกันการเกิดความเสียหายต่อเซลล์จากการถูกเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน รูป A คือลักษณะและรูปร่างของเซลล์กลุ่มควบคุม รูป B คือเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ 800 µM H ₂ O ₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และรูป C-H คือเซลล์ที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับ H ₂ O ₂ ที่ความเข้มข้น	46
ภาพ 20 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ H ₂ O ₂ ความเข้มข้น 800 µM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามด้วยโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Mean±SD) .	49
ภาพ 21 คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสจาก <i>A. platensis</i> ในการลดความเสียหายและฟื้นฟูเซลล์จากการถูกเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H ₂ O ₂ รูป A คือลักษณะและรูปร่างของเซลล์กลุ่ม control รูป B คือเซลล์ที่ได้รับ 800 µM H ₂ O ₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และรูป C-H คือเซลล์ที่ได้รับ H ₂ O ₂ ความเข้มข้น 800 µM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นได้รับโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	49
ภาพ 22 แสดงระดับการสะสม ROS ภายในเซลล์ L6 ได้รับ 800 µM H ₂ O ₂ , 750 µg/ml APH หรือทั้ง 800 µM H ₂ O ₂ และ 750 µg/ml APH เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทำการเติม 100 µM DCFH-DA เป็นเวลา 30 นาที ที่ 37 °C ในที่มีด ความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ภายในเซลล์ของเซลล์ L6 ถูกวัดโดย Microplate reader (Mean±SD)	51
ภาพ 23แสดงระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์ L6 เมื่อได้รับ800 µM H ₂ O ₂ และ 750 µg/ml APH เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือทั้ง 750 µg/ml APH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วย 800 µM H ₂ O ₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทำการเติม 100 µM DCFH-DA เป็นเวลา 30 นาที ที่ 37°C ในที่มีความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ภายในเซลล์ของเซลล์ L6 ถูกวัดโดย Microplate reader (Mean±SD).....	52

ภาพ 24 การศึกษาการแสดงออกของยีน SOD1 (A) GPx1 (B) และ CAT (C) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย <i>A. platensis</i> ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR (Mean±SD)	53
ภาพ 25 การศึกษาการแสดงออกของยีน SOD1 (A) GPx1 (B) และ CAT (C) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย <i>A. platensis</i> ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันโดยการเติม H ₂ O ₂ ที่ความเข้มข้น 150 μ M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR (Mean±SD)	55
ภาพ 26 แสดงการแสดงออกของยีน MuRF1 (A) และ Atrogin-1 (B) ของเซลล์ L6 เมื่อได้รับ 1 μ M Dex, 750 μ g/ml APH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รวมทั้งได้รับ 750 μ g/ml APH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วย 1 μ M Dex เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR (Mean±SD)	56
ภาพ 27 Flow chart แสดงสรุปผลการวิจัย	67
ภาพ 28 ภาพรวมของงานวิจัย	67

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โครงสร้างประชากรโลกในปัจจุบันมีประชากรผู้สูงอายุเพิ่มมากขึ้น เมื่ออายุเพิ่มขึ้นจะเกิดความเสื่อมของร่างกายตามมาและทำให้เกิดความเจ็บป่วยต่างๆ ภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลง (sarcopenia) เป็นกลุ่มอาการที่พบบ่อยในผู้สูงอายุ (geriatric syndrome) (Promklang D., 2018) ซึ่งกล้ามเนื้อถือเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของร่างกาย (Preedy et al., 2001) การสูญเสียมวลกล้ามเนื้อและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อเมื่อมีอายุเพิ่มขึ้นนั้นเป็นกระบวนการหนึ่งของการเกิดภาวะชราภาพ หลังจากอายุ 50 ปีจะเกิดการลดลงของมวลกล้ามเนื้อในอัตรา 1-2 % ต่อปี (von Haehling, Morley, & Anker, 2010) สภาวะดังกล่าวอาจนำไปสู่การมีคุณภาพชีวิตที่แย่ลงในเรื่องของการเคลื่อนไหวและการขยับร่างกาย ทำให้ผู้สูงอายุเสี่ยงต่อการเกิดอุบัติเหตุและอาจนำไปสู่การเสียชีวิตได้ (Santilli, Bernetti, Mangone, & Paoloni, 2014) สาเหตุของการเกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงในผู้สูงอายุนั้นมีสาเหตุหลายประการ เช่น ความบกพร่องในการทำงานของระบบประสาทสั่งการ (motor neuron) (Brown, 1972) การลดลงของ anabolic hormones (Gundersen, 1998) รวมถึงการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรียในเซลล์กล้ามเนื้อ (Johnson, Robinson, & Nair, 2013) นอกจากนี้หนึ่งในปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงคือการสะสมของ ROS ภายในร่างกาย โดยพบว่าในเนื้อเยื่อของคนที่อยู่ในวัยสูงอายุจะมีการสร้างและสะสมอนุมูลอิสระมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่ง ROS ในปริมาณที่สูงจะส่งผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ รวมถึงทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน เป็นต้น (Fulle et al., 2004) Ubiquitin proteasome system (UPS) เป็น pathway หลักที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของโปรตีนกล้ามเนื้อที่หมดอายุการใช้งานแล้ว โดยมีการศึกษาพบว่ากระบวนการ UPS มียีนสองยีนคือ atrogen-1 (muscle atrophy F-box) และ muscle ring finger 1 (MuRF1) เป็นยีนที่เข้ารหัสสำหรับ E3 (ubiquitin protein ligase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำต่อ substrate ในกระบวนการสลายโปรตีนผ่าน UPS (Bodine et al., 2001) โดยจะมีการแสดงออกเฉพาะในกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscles) และกล้ามเนื้อโครงร่าง (skeletal muscles) และทำหน้าที่ในการควบคุมการสลายตัวของกล้ามเนื้อ (Cao, Kim, & Lecker, 2005) จึงชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของ atrogen-1 และ MuRF1 อาจใช้เป็น marker ที่สามารถบ่งชี้ได้ว่ากล้ามเนื้อโครงร่างเกิดการสลายผ่านกระบวนการ UPS (Latres et al., 2005)

A. platensis เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้รับการรับรองจาก Food and Drug Administration (FDA) ว่าเป็นความปลอดภัยต่อผู้บริโภค อุดมไปด้วยโปรตีนสูงถึง 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นในกลุ่มของ Aromatic amino acids ได้แก่ phenylalanine และ tryptophan สูง (Pyne PK, 2017) ซึ่งมีรายงานวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นว่า Aromatic amino acids สามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระเพื่อกำจัด (Liu, Jin, Lin, Jones, & Chen, 2015) และที่สำคัญมีรายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ที่ได้จากกระบวนการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเสทของ *A. platensis* สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดีกว่าโปรตีนจากสัตว์ เช่น เวย์โปรตีน และยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Zhang, Yokoyama, & Zhang, 2012) และที่สำคัญมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) สูง โดยมี % DPPH scavenging activity สูงถึง 81.44 ± 0.43 ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีฤทธิ์เทียบเท่ากับ glutathione ($82.63 \pm 0.56\%$) (Yu et al., 2016)

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการเกิดการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อเมื่ออายุมากขึ้นและการเกิดอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงในผู้สูงอายุ ดังนั้นการลดการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อและการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระจึงเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันและลดการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อในผู้สูงอายุ ในวิทยานิพนธ์นี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาการฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการปกป้องเซลล์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผลิตจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* โดยใช้เซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6 Rat skeletal muscle cell) เป็นโมเดลในการศึกษา โดยผู้วิจัยได้ทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก *A. platensis* โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปกป้องเซลล์กล้ามเนื้อ โดยได้ทำการศึกษาความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเสทในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระและลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในเซลล์กล้ามเนื้อหนู ผลการวิจัยที่ได้จากวิทยานิพนธ์นี้อาจนำไปสู่การพัฒนาโปรตีนไฮโดรไลเสทจาก *A. platensis* ไปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีคุณสมบัติป้องกันการสูญเสียกล้ามเนื้อ ลดอนุมูลอิสระ และเสริมสร้างสุขภาพต่อไป

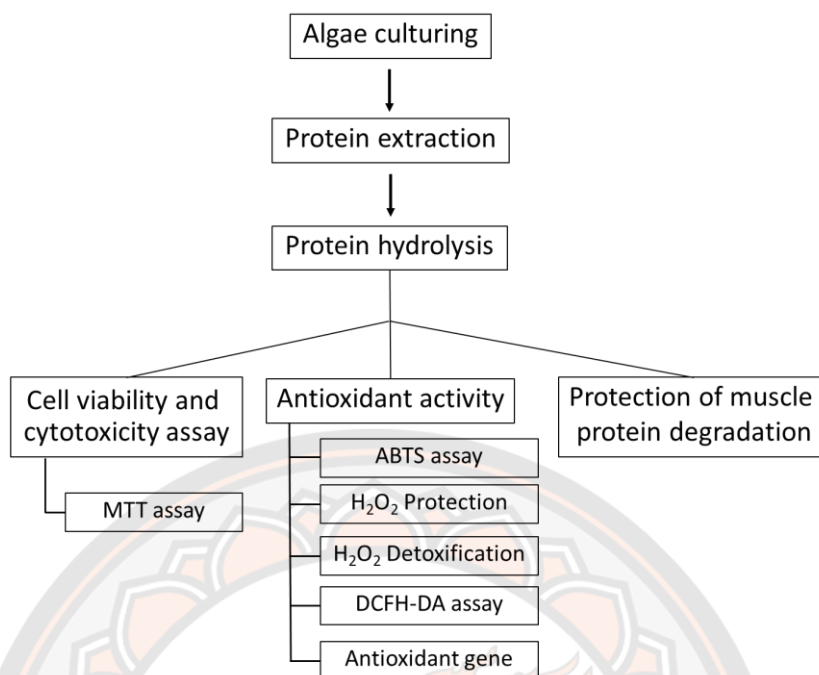
จุดมุ่งหมายของการวิจัยจุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ผลิตจากสาหร่าย *A. platensis* ในเซลล์กล้ามเนื้อ
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ผลิตจากสาหร่าย *A. platensis*

ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซสจากสาหร่าย *A. platensis* โดยกระบวนการทางเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis) จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่

1. ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ได้ด้วยวิธี ABTS assay ศึกษาคุณสมบัติในการป้องกันและกำจัดอนุมูลอิสระของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์กล้ามเนื้อ ศึกษาคุณสมบัติการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงศึกษาคุณสมบัติในการลดระดับการสะสม ROS ภายในเซลล์ด้วยวิธี DCFH-DA assay
2. ศึกษาคุณสมบัติในการป้องกันการสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อในเซลล์กล้ามเนื้อ โดยศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนไฮโดรไลเซสและดูอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)



ภาพ 1 Flow chart ขอบเขตการศึกษา

นิยามศัพท์เฉพาะ

RT-PCR	(Reverse Transcription-Polymerase chain reaction)
ABTS	(2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
BCAAs	(Branched-chain amino acids)
Atrogin-1	(Muscle atrophy F-box)
MuRF1	(Muscle ring finger 1)
UPS	(Ubiquitin proteasome system)
DCFH-DA	(2'-7'dichlorofluorescein diacetate)
H ₂ O ₂	(Hydrogen peroxide)
ROS	(Reactive oxygen species)
SOD1	(Superoxide dismutase 1)
GPx1	(Glutathione peroxidase 1)
CAT	(Catalase)
APH	(<i>Arthrospira platensis</i> protein hydrolysate)
ML	(Milliliter)

μM	(Micro molar)
μg	(Microgram)
bp	(Base pair)
cDNA	(Complementary deoxyribonucleic acid)
RNA	(Ribonucleic acid)
DMSO	(Dimethyl sulfoxide)
FBS	(Fetal bovine serum)
IC_{50}	(Half maximal inhibitory concentration)
CO_2	(Carbon dioxide)

สมมุติฐานของการวิจัย

1. โปรตีนไฮโดรไลสที่ผลิตจากสาหร่าย *A. platensis* มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ
2. โปรตีนไฮโดรไลสที่ผลิตจากสาหร่าย *A. platensis* มีความสามารถในการลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในเซลล์กล้ามเนื้อหนู

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ระบบกล้ามเนื้อ (Muscular system)

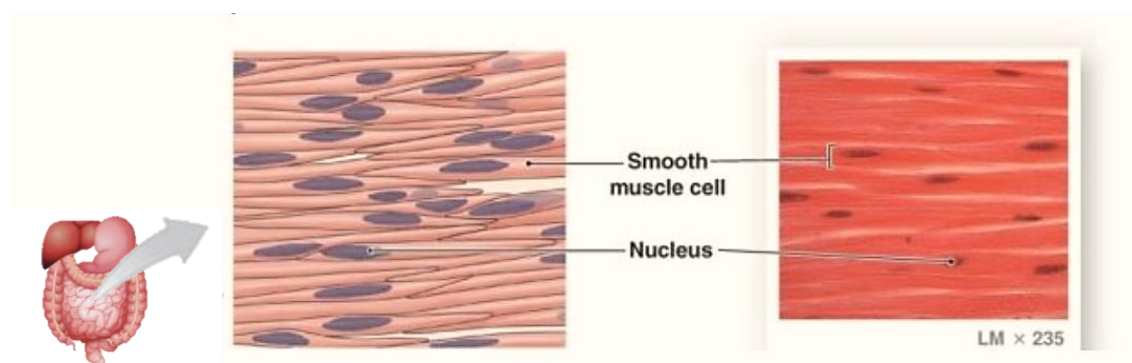
กล้ามเนื้อ (Muscle) เป็นเนื้อเยื่อที่หดตัวได้ในร่างกาย เปลี่ยนแปลงมาจากเมโซเดิร์ม (mesoderm) ของชั้นเนื้อเยื่อในตัวอ่อน และเป็นระบบหนึ่งของร่างกายที่สำคัญต่อการเคลื่อนไหวทั้งหมดของร่างกาย ซึ่งกล้ามเนื้อนั้นเป็นส่วนประกอบใหญ่ของร่างกายมนุษย์ และเป็นส่วนสำคัญที่สุด กล้ามเนื้อในร่างกายทั้งหมดมีน้ำหนักประมาณ 2/5 ของน้ำหนักตัว ร่างกายแบ่งกล้ามเนื้อออกเป็น 3 ชนิด คือ กล้ามเนื้อยึดกระดูกหรือกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle or striated muscle), กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) และกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle) โดยที่กล้ามเนื้อลายนั้นถูกควบคุมอยู่ภายใต้อำนาจจิตใจหรือรีเฟล็กซ์ ส่วนกล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อหัวใจทำงานนอกอำนาจจิตใจ โดยกลไกเหล่านั้นมีทำหน้าที่หดตัวเพื่อให้เกิดแรงและทำให้เกิดการเคลื่อนที่ (motion) รวมถึงการเคลื่อนที่และการหดตัวของอวัยวะภายใน ซึ่งกล้ามเนื้อจำนวนมากหดตัวได้นอกอำนาจจิตใจ และจำเป็นต่อการดำรงชีวิต เช่น การบีบตัวของหัวใจ หรือการบีบรัด (peristalsis) ทำให้เกิดการผลักดันอาหารเข้าไปภายในทางเดินอาหาร การหดตัวของกล้ามเนื้อที่อยู่ใต้อำนาจจิตใจมีประโยชน์ในการเคลื่อนที่ของ ร่างกาย และสามารถควบคุมการหดตัวได้ เช่น การกลอกตา หรือการหดตัวของกล้ามเนื้อควอดริเซ็บ (quadriceps muscle) ที่ต้นขาใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) ที่อยู่ใต้อำนาจจิตใจแบ่งกว้างๆ ได้เป็น 2 ประเภทคือ กล้ามเนื้อ fast twitch และกล้ามเนื้อ slow twitch กล้ามเนื้อ slow twitch สามารถหดตัวได้เป็นระยะเวลานานแต่ให้แรงน้อย ในขณะที่กล้ามเนื้อ fast twitch สามารถหดตัวได้รวดเร็วและให้แรงมากแต่ล้าได้ง่าย

ชนิดของกล้ามเนื้อ (Types of muscle)

กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle)

กล้ามเนื้อเรียบ (Smooth Muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่ทำงานนอกอำนาจจิตใจ พบที่อวัยวะภายในของร่างกายเช่น หลอดอาหาร หลอดเลือด เป็นต้น เซลล์มีรูปร่างคล้ายกระสวย แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสอันเดียวอยู่ตรงกลางเซลล์ เซลล์ไม่มีลายตามขวาง ดังภาพ 2 ตรงรอยต่อของเยื่อหุ้มเซลล์บางส่วนจะมีบริเวณถ่ายทอดคลื่นประสาทเรียกว่า อินเตอร์คอนเนกติง บริดจ์ (interconnecting bridge) เพื่อถ่ายทอดคลื่นประสาทไปยังเซลล์ข้างเคียง การทำงานของกล้ามเนื้อชนิดนี้อยู่นอกอำนาจจิตใจ การหดตัวเกิดได้เองโดยมีเซลล์เริ่มต้นการทำงาน (pace maker cell point) และการหดตัวถูก

ควบคุมโดยระบบประสาทอัตโนมัติ ดังนั้นกล้ามเนื้อชนิดนี้ปลายประสาทจึงไม่ได้ไปเลี้ยงทุกเซลล์ ยกเว้นกล้ามเนื้อเรียบในบางส่วนของร่างกายมีปลายประสาทไปเลี้ยงทุกเซลล์ เช่น กล้ามเนื้อในลูกตา กล้ามเนื้อชนิดนี้เรียกว่า กล้ามเนื้อเรียบหลายหน่วย (multiunit smooth muscle) ส่วนกล้ามเนื้อเรียบชนิดแรกที่กล่าวถึงในตอนต้นเรียกว่า กล้ามเนื้อหน่วยเดียว (single unit smooth muscle)

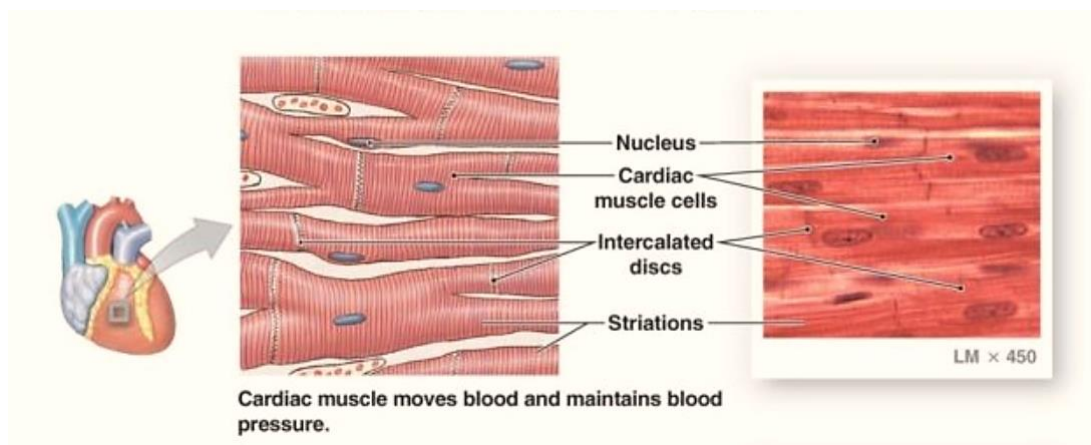


ภาพ 2 ลักษณะของกล้ามเนื้อเรียบ (Smooth muscle)

ที่มา: <http://www.6aming.com> สืบค้นเมื่อวันที่ 8/10/2561

กล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac muscle)

กล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac Muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่ทำงานนอกอำนาจจิตใจ พบที่หัวใจเพียงแห่งเดียว กล้ามเนื้อหัวใจมีเซลล์เป็นเส้นใยยาว มีลายตามขวาง เซลล์เรียงตัวหลายทิศทาง และเซลล์มีแขนงเชื่อมเซลล์อื่นเรียกว่า อินเตอร์คาเลเทต ดิสก์ (intercalated disc) มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง เซลล์เป็นรูปไข่ ดังภาพ 3 เซลล์บางกลุ่มเปลี่ยนแปลงหน้าที่ไปเป็นเซลล์นำคลื่นประสาท (special conducting system) ซึ่งได้แก่ เอ-วี บันเดิล (A-V bundle) และเส้นใยเพอร์คินเจ (perkinje fiber) การทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจอยู่นอกอำนาจจิตใจและทำงานได้เอง



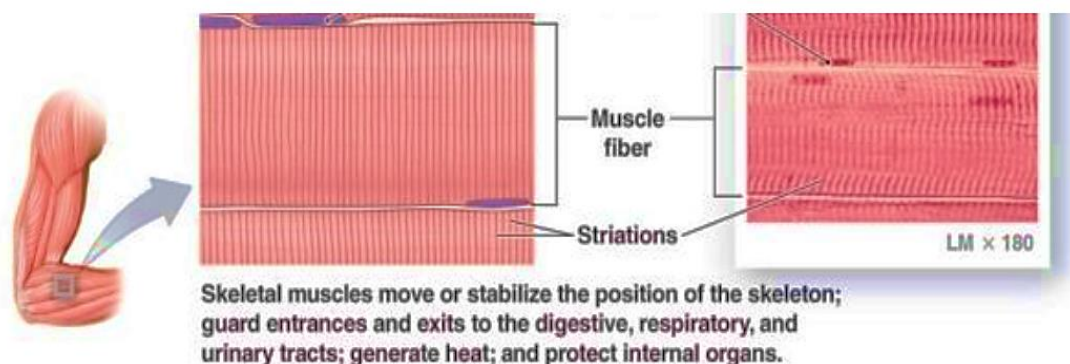
ภาพ 3 ลักษณะของกล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiac muscle)

ที่มา: <http://www.6aming.com> สืบค้นเมื่อวันที่ 8/10/2561

กล้ามเนื้อลาย (Striated muscle)

กล้ามเนื้อลาย (Striated Muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่พบมากที่สุดในร่างกายโดยจะยึดเกาะอยู่กับกระดูกทั่วทุกส่วนของร่างกาย เช่น แขน ขา ลำตัว ใบหน้า ทำให้เราสามารถเคลื่อนไหวส่วนต่างๆ ดังกล่าวได้ จึงอาจเรียกกล้ามเนื้อลายอีกอย่างหนึ่งว่า กล้ามเนื้อยึดกระดูกหรือกล้ามเนื้อโครงร่าง (Skeletal Muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่ทำงานอยู่ภายใต้อำนาจจิตใจ กล้ามเนื้อลายประกอบด้วยเซลล์ลักษณะเป็นเส้นยาวจึงเรียกว่า ไยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) ดังภาพ 4 ความยาวของใยกล้ามเนื้อจะเท่ากับมัดกล้ามเนื้อที่ใยกล้ามเนื้อนั้นเป็นองค์ประกอบอยู่ใยกล้ามเนื้อมีลายตามขวางและมีเยื่อหุ้มเซลล์เรียกว่า ซาร์โคเลมมา (sarcolemma) ซึ่งมีเนื้อเยื่อประสานหุ้มอีกชั้นหนึ่งเรียกว่า เอนโดไมเซียม (endomysium) ไยของกล้ามเนื้อลายมีนิวเคลียสหลายอันอยู่ด้านข้างของเซลล์ เรียงตัวกันเป็นระยะตลอดแนวความยาวของเซลล์ แต่ละเซลล์มีปลายประสาทมาเลี้ยง เพื่อกระตุ้นให้เกิดการหดตัว ไยกล้ามเนื้อลายประกอบด้วยเส้นใยขนาดเล็กเรียกว่า ไมโอไฟบริล (myofibril) แต่ละไมโอไฟบริลประกอบด้วยฟิลาเมนต์ (filament) ซึ่งมี 2 ชนิด คือ

1. ฟิลาเมนต์ชนิดหนา (Thick Filament) ประกอบด้วยโปรตีนซึ่งเรียกว่า ไมโอซิน (Myosin) รวมตัวกันเป็นมัด โดยแต่ละมัดประกอบด้วยโมเลกุลของไมโอซินที่เกิดจากโปรตีน 2 สาย พันกันเป็นเกลียวตรงปลายสุดของแต่ละสายจะม้วนตัวเป็นก้อนกลมคล้ายตะขอ
2. ฟิลาเมนต์ชนิดบาง (Thin Filament) ประกอบด้วยโปรตีนซึ่งเรียกว่า แอกทิน (Actin) ที่มีลักษณะเป็นก้อนกลม (Globula Actin Molecules) เรียงต่อกันเป็นสายยาวที่พันกันเป็นเกลียว



ภาพ 4 ลักษณะของกล้ามเนื้อลาย (Striated Muscle muscle)

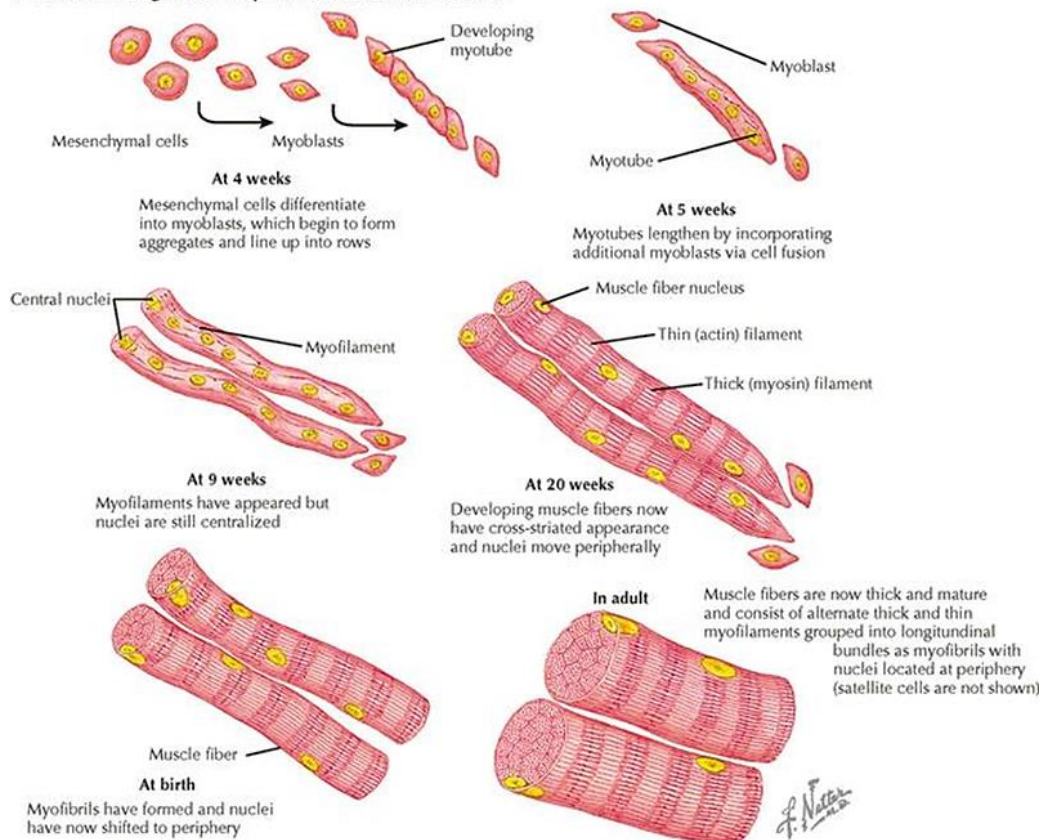
ที่มา: <http://www.6aming.com> สืบค้นเมื่อวันที่ 8/10/2561

การพัฒนาของระบบกล้ามเนื้อ (Development of the muscular system)

การเจริญของกล้ามเนื้อลาย

เซลล์กล้ามเนื้อเจริญมาจาก mesoderm กล้ามเนื้อลาย เกือบทั้งหมดร่างกายเจริญมาจาก myotome ของ somite และบางส่วนเจริญมาจาก bronchial arches ซึ่งเซลล์เริ่มต้นของเซลล์กล้ามเนื้อในระยะตัวอ่อน มีลักษณะเป็น mononucleated cell และรูปกระสวย ที่มีการแบ่งตัวเรื่อยๆ และต่อมา ส่วนต่างๆ ใน cytoplasm ของเซลล์จะเปลี่ยนไป มี myofibrillar protein พอร์มขึ้น หยุดการแบ่งตัวแบบ mitosis เซลล์นี้เรียกว่า “myoblast” ต่อมา cytoplasm ของ myoblast หลายๆ เซลล์จะมาเชื่อมกัน ได้เป็น myotubule มีลักษณะ multinucleated และ nuclei เรียงตัวกันในลักษณะเป็นลูกโซ่มี contractile filament พอร์มขึ้น คือ actin และ myosin เมื่อเซลล์เจริญขึ้น contractile filament จัดตัวกันเป็น banding (cross-striated) และ nucleus ถูกเบียดไปอยู่ที่ขอบ กลายเป็น skeletal muscle fiber ดังภาพ 5

▼ Successive stages in development of skeletal muscle fibers.



ภาพ 5 การเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อลาย

ที่มา: <https://basicmedicalkey.com/muscle-tissue-3/> สืบค้นเมื่อวันที่ 8/10/2561

กล้ามเนื้อที่เจริญจาก myotome ได้แก่ trunk muscle โดยเฉพาะ intercostals muscles และ muscles of the vertebral column ซึ่งยังคงมีลักษณะเป็นปล้องเหมือน somites กล้ามเนื้อที่เจริญทาง dorsal และ ventral ของ vertebral column เรียกว่า epaxial และ hypaxial trunk muscles ตามลำดับ กล้ามเนื้อแขน ขา เชื่อว่ามาจาก mesenchyme ที่บริเวณนั้น ฟอรัมเป็น myoblast แล้วมารวมกันเรียกว่า blastemal

การเจริญของกล้ามเนื้อเรียบ

กล้ามเนื้อเรียบเจริญจาก splanchnic mesoderm ซึ่งบุอยู่รอบๆ hollow intestinal organs และมีลักษณะการกำเนิดเช่นเดียวกับกล้ามเนื้อลาย ปกติท่อทางเดินอาหาร ประกอบไปด้วยกล้ามเนื้อ inner circular และ outer longitudinal มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับ peristalsis ส่วนกล้ามเนื้อในมดลูก กระเพาะปัสสาวะ เรียงตัวกันแบบ irregularly interlacing bands

การเจริญของกล้ามเนื้อหัวใจ

เจริญจาก splanchnic mesoderm ซึ่งต่อมามี myofibril ใน cytoplasm มากมาย และยังสามารถในการแบ่งตัวต่อไปอีก และเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจไม่มีลักษณะ syncytium เหมือนกล้ามเนื้อลาย แต่จะสร้าง intercalated disks เป็นตัวเชื่อมระหว่างเซลล์ ลักษณะการทำงานแบบ involuntary

อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มี unpaired electron อย่างน้อย 1 electron เกิดขึ้นเมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออกทำให้อนุมูลอิสระไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น ผลที่ตามมาคือโมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนแล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปทำให้เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) (Cornelli, 2009) อนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการ oxidized สารชีวโมเลกุลในร่างกายเรียกว่า Reactive species (RS) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปของ reactive oxygen species (ROS) และยังพบในรูปของ reactive chlorine species (RCS) และ reactive nitrogen species (RNS) หรืออาจจะพบได้ในรูปของ lipid radical หรือ genetic radical นอกจากนี้ RS อาจจะอยู่ในสารประกอบ บางโมเลกุลที่อยู่ในรูป non-radical แต่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา oxidation เช่น H_2O_2 ก็จัดเป็น RS เช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า RS ไม่จำเป็นต้องอยู่ในรูปของ free radical เสมอ (Lockwood, 2007) ดังตาราง 1

ตาราง 1 ตัวอย่างของ RS โดยแบ่งประเภทตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation และแบ่งย่อยโดยลักษณะของการ เป็น radical ของโมเลกุล ที่มา: (Lockwood, 2007)

Type of RS	Free radicals	Formula	Non-radicals	Formula
ROS	Oxygen radical	$O_2^{\bullet}$	Singlet oxygen	$O_2^{\bullet}$
	Superoxide radical	$O_2^{\bullet -}$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
	Hydroxyl radical	$OH^{\bullet}$	Ozone	O_3
	Hydroperoxyl radical	$HO_2^{\bullet}$		
	Peroxyl radical	$RO_2^{\bullet}$		
	Alkoxy radical	$RO^{\bullet}$		
	Carbonate radical	$CO_3^{\bullet -}$		
RNS	Nitric oxide radical	$NO^{\bullet}$	Nitric oxide	HNO_2
	Nitrogen dioxide radical	$NO_2^{\bullet}$	Peroxynitrite	$ONOO^{\bullet}$
			Peroxynitrous acid	$ONOOH$
			Nitryl chloride	$NOOCl$
RCS	Chlorine radical	$Cl^{\bullet}$	Hypochloric acid	$HOCl$
			Nitryl chloride	NO_2Cl
			Chlorine gas	Cl_2

ROS เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แหล่งที่แตกต่างกันดังนี้

1. ปัจจัยภายในร่างกาย (Endogenous Sources) ROS จะเกิดขึ้นจากกระบวนการต่างๆ ของร่างกายผ่านกระบวนการสร้าง ATP โดย O_2 จะเปลี่ยนไปเป็น H_2O โดยปกติร่างกายของมนุษย์จะต้องการ ATP วันละ 300 mol ซึ่งจะได้จากการใช้ O_2 จำนวน 100 mol ซึ่ง ROS ที่เกิดขึ้นนั้นจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นน้ำโดยผ่านเอนไซม์และบางขั้นตอนก็ผ่านปฏิกิริยาโดยไม่ใช้เอนไซม์ นอกจากการสร้างพลังงานแล้ว ในกลไกป้องกันตัวเองของร่างกายเมื่อสิ่งแปลกปลอม (pathogen) เข้าสู่ร่างกายจะเกิดการสร้าง ROS ขึ้นมาได้เช่นกัน โดยเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า oxidative burst เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเช่น macrophage และ leukocyte ถูกกระตุ้น โดยสิ่งเร้าต่างๆจะมีการสร้าง $O_2^{\bullet -}$ ขึ้นผ่านทาง NADPH oxidase โมเลกุล $O_2^{\bullet -}$ ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนต่อไปเป็น H_2O_2 และเกิด เป็น hypochlorite (HOCl) ในที่สุด (Nimse S.B, 2015)

2. ปัจจัยภายนอกร่างกาย (Exogenous Sources) ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมมีส่วนอย่างมากในการกระตุ้นให้เกิด ROS โดยเฉพาะอย่างยิ่งรังสีต่างๆ เช่น UV, X- ray, Gamma ray โดยรังสีเหล่านี้จะกระตุ้นให้น้ำเปลี่ยนไปเป็น hydroxyl radical หรือแม้แต่มลภาวะทางเคมีเช่น paraquat จะกระตุ้นให้เกิด peroxide หรือ ozone สารพวก quinones และ nitroaromatics ก็ทำให้เกิด superoxide ได้ (Nimse S.B, 2015)

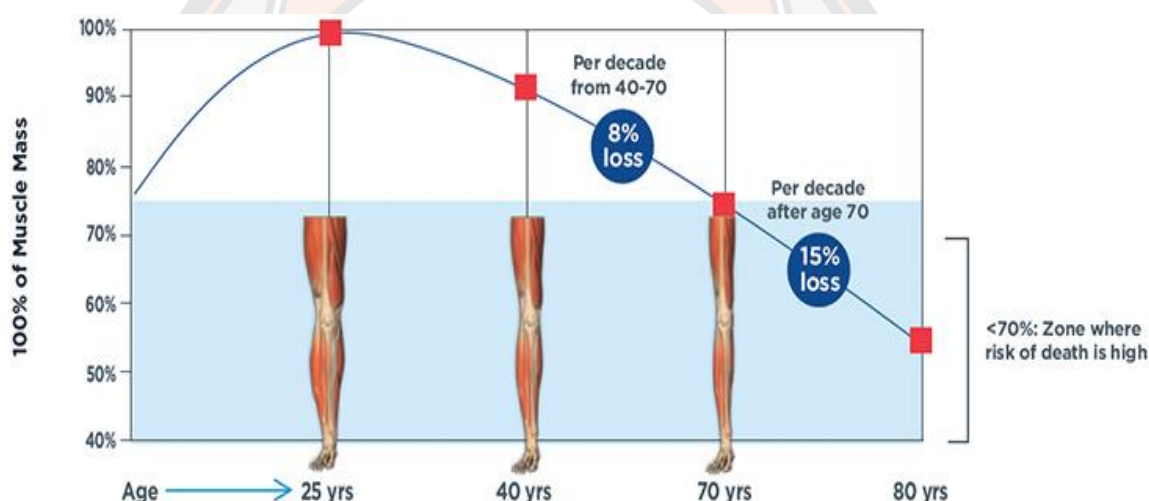
หากร่างกายมีกระบวนการผลิต ROS มากเกินไป หรือการที่ร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้มีการ สะสมของ ROS มากขึ้นส่งผลให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นได้และเมื่อเกิดสภาวะนี้นานจะทำให้เกิดผลเสียต่อร่างกายทำให้มีความเสี่ยงต่อการถูกทำลายเนื้อเยื่อต่างๆ เยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึง DNA ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดโรคในระบบต่างๆและนำไปสู่ความเสื่อมของอวัยวะได้ เช่น โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคทางสมองและระบบประสาท เช่น Parkinson และ Alzheimer ผลต่อระบบต่อมไร้ท่อต่างๆ มะเร็ง รวมไปถึงมีผลต่อความยืดหยุ่นของผิวหนัง (H. Li, Horke, & Förstermann, 2013) นอกจากนี้ยัง พบว่า ROS มีผลทำให้เกิดการสูญเสียกล้ามเนื้อ ทำให้มวลกล้ามเนื้อลดลง [(Miquel J,1993); (Hunt J, 1998)]

ความชราของกล้ามเนื้อและภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลง (Muscle aging and Sarcopenia)

ความชราภาพเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้และเป็นความซับซ้อนในกระบวนการของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นลักษณะที่ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการทำงานของระบบสำคัญของร่างกายที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพทั้งทางกายภาพและฟังก์ชันทางชีวเคมีที่เป็นกระบวนการหลัก (Buonocore, Rucci, Vandoni, Negro, & Marzatico, 2011) จะสังเกตได้ว่าระหว่างที่อยู่ช่วงวัยสูงอายุจะเกิดการเปลี่ยนแปลงหลายอย่างที่เกิดขึ้น เช่น ความสามารถในการใช้ออกซิเจนลดลงพร้อมกับการเกิดความบกพร่องในการทำงานของหลอดเลือดในหัวใจ, เกิดการปรับเปลี่ยนของระบบหายใจ, การเสื่อมสภาพของระบบประสาท รวมไปถึงความเสื่อมสภาพของมวลกล้ามเนื้อซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณในเส้นใยกล้ามเนื้อโดยเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยกล้ามเนื้อจะลดลง (Mecocci et al., 1999)

กล้ามเนื้อถือเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของร่างกาย (Preedy et al., 2001) และการที่เกิดการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อนั้นมีความเกี่ยวข้องกับอายุ ดังภาพ 6 ซึ่งคล้ายกับว่าเป็นกระบวนการหนึ่งของการเกิดความชราภาพที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ หลังจากอายุ 50 ปีไปแล้วจะเกิดการลดลงของมวลกล้ามเนื้อในอัตรา 1-2 % ต่อปี (von Haehling et al., 2010) โดยสภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงหรือที่เรียกว่า Sarcopenia นั้นเป็นสภาวะที่มีลักษณะการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพซึ่งอาจนำไปสู่การ

มีคุณภาพชีวิตที่ย่ำแย่ในเรื่องของการเคลื่อนไหวและการขยับร่างกายนอกจากนี้อาจนำไปสู่การเสียชีวิตได้ (Santilli et al., 2014) ซึ่งสาเหตุของการเกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงมีหลายสาเหตุ เช่น ความบกพร่องในการทำงานของระบบประสาทสั่งการ (motor neuron) (Brown, 1972) การลดลงของแอนนาบอลิกฮอร์โมน (anabolic hormones) เช่น growth hormone, testosterone และ estrogen (Gundersen, 1998) ไมโทคอนเดรียในเซลล์กล้ามเนื้อสูญเสียการทำงาน (Matthew L. et al, 2012) รวมไปถึงการเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species : ROS) (Mecocci et al., 1999) เมื่ออายุเพิ่มขึ้นจะเกิดการผลิต ROS เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เกิดการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งส่งผลเสียต่อการทำงานของกล้ามเนื้อ [(Miquel J,1993); (Hunt J, 1998)]



ภาพ 6 การลดลงของมวลกล้ามเนื้อเมื่ออายุมากขึ้น

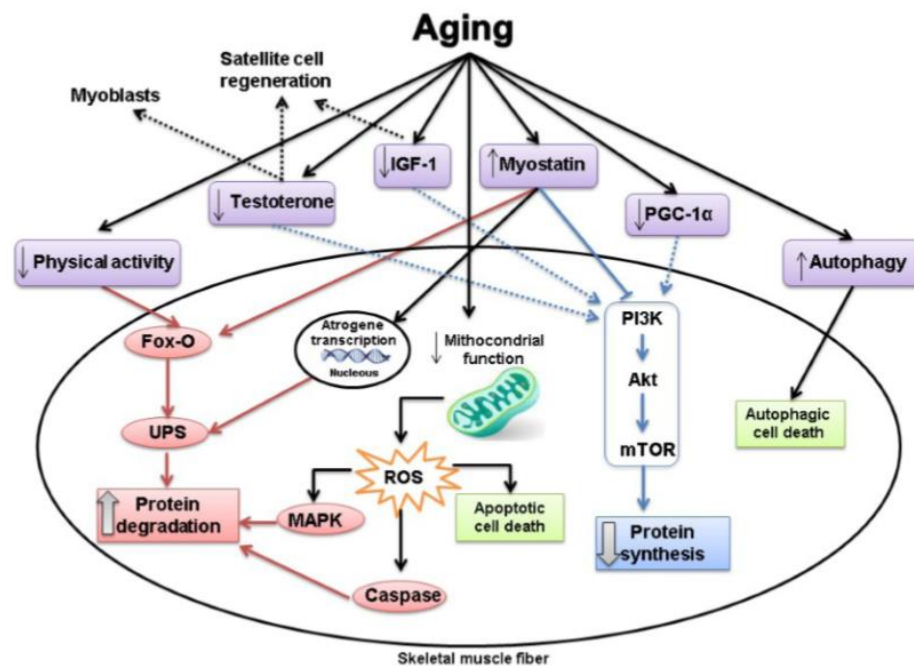
ที่มา: <http://fightsarcopenia.com/lbm-loss> สืบค้นเมื่อวันที่ 8/10/2561

การบำรุงรักษาสรีรวิทยาของมวลกล้ามเนื้อโครงร่าง (skeletal muscle) ขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่าง anabolic และ catabolic factors ผลการลดลงของกล้ามเนื้อเกิดจากการลดลงของการสังเคราะห์โปรตีนกล้ามเนื้อและ/หรือการสลายตัวของโปรตีนกล้ามเนื้อที่เพิ่มมากขึ้น มีหลักฐานมากมายที่พบว่ากระบวนการสังเคราะห์โปรตีนจะลดลงเมื่ออายุมาก (Ebner, Sliziuk, Scherbakov, & Sandek, 2015) การสังเคราะห์โปรตีนของ anabolic pathway ที่สำคัญจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) และ serine threonine kinase

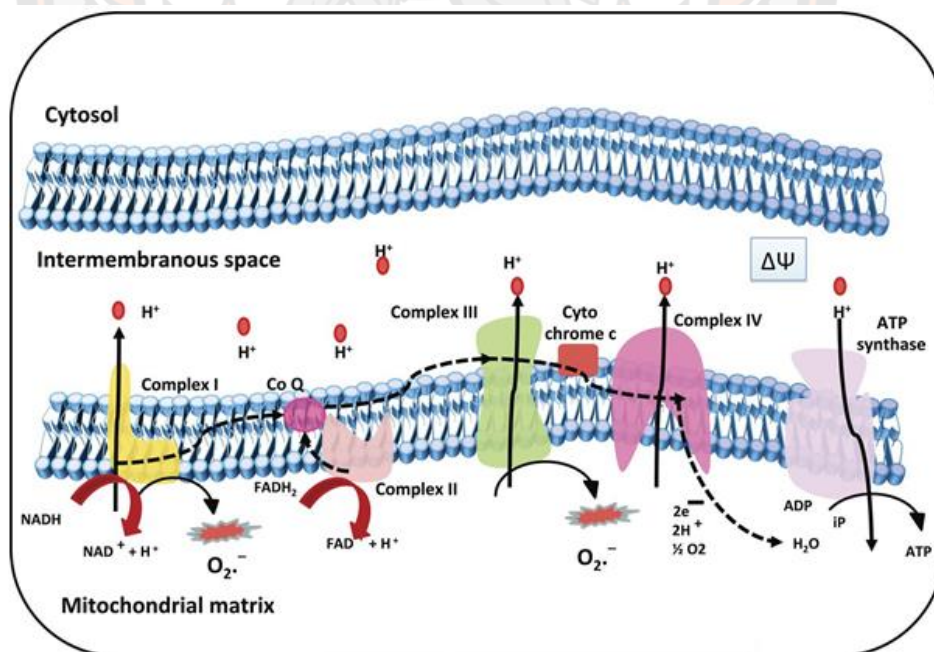
(Akt) โดยผ่านกระบวนการเกิด phosphorylation ซึ่งกระตุ้นให้ mammalian target of rapamycin (mTOR) เกิดการทำงาน ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มมากขึ้น (Bodine et al., 2001) สิ่งกระตุ้นที่สำคัญที่สุดคือกลุ่มของ anabolic hormones ได้แก่ insulin, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), testosterone รวมถึงการออกกำลังการร่วมด้วย (Sandri, 2008) โดยฮอร์โมน testosterone สามารถกระตุ้น myoblasts และ satellite cells (Bhasin et al., 2003) ส่วน IGF-1 ช่วยกระตุ้นกระบวนการ proliferation ของ satellite cell (Husmann, Soulet, Gautron, Martelly, & Barritault, 1996) และยับยั้งการย่อยสลายโปรตีน (Bowen, Schuler, & Adams, 2015) ซึ่งกลไกที่ได้กล่าวมาข้างต้นเหล่านี้ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมเยื่อหุ้มเซลล์และรักษามวลกล้ามเนื้อที่จะลดลงเมื่อมีอายุมากขึ้น ซึ่งความแก่ชราที่ส่งผลให้ physical activity, IGF-1 และระดับฮอร์โมน testosterone นั้นลดต่ำลง ทำให้เกิด insulin resistance, mitochondrial dysfunction ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนในกล้ามเนื้อลดลง (Ali & Garcia, 2014)

ดังภาพ 7 แสดงให้เห็นว่า การที่ physical activity นั้นลดต่ำลง จะส่งผลทำให้ transcription factor Fox-O ไปกระตุ้นการทำงานของกระบวนการ ubiquitin proteasome system (UPS) เกิดการสลายโปรตีนเพิ่มขึ้น ในขณะเดียวกันภาวะ aging ทำให้ระดับของ myostatin สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการย่อยสลายโปรตีนผ่าน UPS และยิ่งส่งผลไปยับยั้งการทำงานของ mTOR pathway ได้อีกด้วย นอกจากนี้การทำงานของ IGF-1 และ testosterone ที่ลดต่ำลง ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้นการทำงานของ mTOR pathway ส่งผลให้มีการสังเคราะห์โปรตีนที่ลดลง และยังพบว่า ความแก่ชราทำให้การทำงานของไมโทคอนเดรียลดลงและมีการผลิต reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่โปรตีนได้ (M. J. Gomes et al., 2017)

หนึ่งในปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลง (sarcopenia) คือการสะสมของ ROS โดยพบว่าเนื้อเยื่อทั้งหมดในร่างกายนั้นสามารถเกิด ROS ขึ้นได้และมักเกิดขึ้นโดยผ่านกระบวนการลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เพื่อสังเคราะห์พลังงานเพื่อใช้ภายในเซลล์ ซึ่ง ROS ที่เกิดจากกระบวนการนี้ส่วนมากจะอยู่ในรูปของ superoxide anion (O_2^-) (Fulle et al., 2004) ดังภาพ 8



ภาพ 7 ผลของอายุใน signaling pathway ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนและการย่อยสลายโปรตีน ที่มา: (M. J. Gomes et al., 2017)



ภาพ 8 กระบวนการ electron transport chain ในไมโทคอนเดรีย
ที่มา: <http://techsemut.com> สืบค้นเมื่อวันที่ 13/10/2561

ในการเกิด ROS นั้นส่งผลทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ที่สามารถทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆภายในเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ, โปรตีน, lipids เป็นต้น ซึ่งจะส่งผลให้ความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อตามมา การผลิต ROS จะเพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วงอายุที่เพิ่มขึ้น โดยมีปัจจัยสองประการคือ การทำงานที่เปลี่ยนแปลงไปของกระบวนการลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) และการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ superoxide Dismutase หรือ (SOD) glutathione peroxidase และ catalase ภายในเซลล์นั้นมีปริมาณไม่เพียงพอ ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าอนุมูลอิสระหรือ ROS มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแก่ชราโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเนื้อเยื่อของคนที่อยู่ในวัยสูงอายุจะมีการสร้างอนุมูลอิสระมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เช่น กล้ามเนื้อโครงร่าง (skeletal muscle) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดของร่างกายและมีการใช้ออกซิเจนในระดับสูงเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่ออื่น ๆ ซึ่งส่งผลทำให้มีปริมาณของ ROS สูงขึ้นตามไปด้วย ทำให้ความสามารถในการเกิดออกซิเดชันในกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของกล้ามเนื้อและมวลของกล้ามเนื้อนั้นลดลง และจะพบได้ว่าในกล้ามเนื้อของคนสูงอายุจะมีไขมันและ DNA ที่เกิดความเสียหายจากการเกิดออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน (Fulle et al., 2004)

การสลายตัวของกล้ามเนื้อ (Muscle degradation)

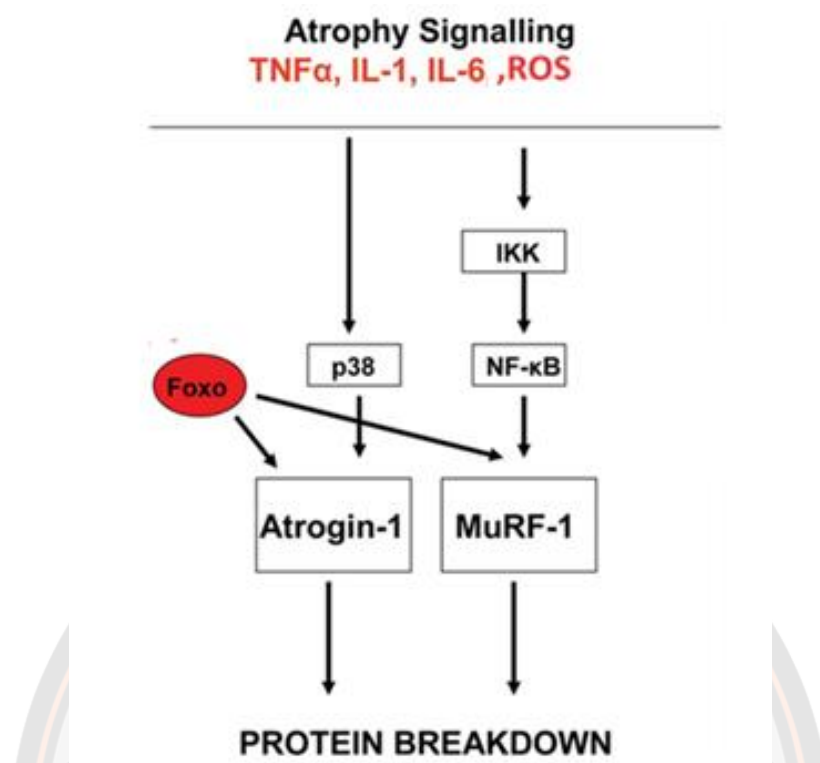
การสลายตัวของกล้ามเนื้อ (muscle degradation) สามารถเกิดขึ้นได้ลักษณะของ Muscle atrophy ซึ่งเป็นการฝ่อของกล้ามเนื้อที่เกิดจากเซลล์กล้ามเนื้อสูญเสียโปรตีนภายในเซลล์ เกิดจากการลดลงของการสังเคราะห์โปรตีนและการเพิ่มขึ้นของการย่อยสลายโปรตีน หรืออาจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งสองอย่างพร้อมกัน สามารถเกิดขึ้นในหลายรูปแบบ เช่น การใช้งานกล้ามเนื้อเป็นเวลานาน ขาดการหล่อเลี้ยงจากระบบประสาท ความชรา และโรคเมเร็ง [(Attaix et al., 2005); (Herningtyas et al., 2008)] การสลายตัวของกล้ามเนื้อนี้จะทำให้มวลกล้ามเนื้อลดลง และเกิดความเมื่อยล้า ซึ่งอาจส่งผลต่อสุขภาพและระดับการดำเนินกิจกรรมทางกายภาพในชีวิตประจำวัน [(Cohen et al., 2009); (Jackman & Kandarian, 2004)] โดยในการใช้กล้ามเนื้อโครงร่างเป็นเวลานานทำให้เกิดการสูญเสีย myofibrillar protein เกิดความตึงเครียดของกล้ามเนื้อและสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่ (Lee K., 2008)

การลดลงของ myofibrillar protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อจะถูกควบคุมโดยผ่านกระบวนการการย่อยสลายโปรตีนคือ autophagy/lysosomal pathway และ ubiquitin proteasome system (UPS) (Jagoe & Goldberg, 2001) เป็นที่รู้จักกันทั่วไปว่า UPS เป็นกระบวนการหลักที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของโปรตีนกล้ามเนื้อที่หมดอายุการใช้งานแล้ว กระบวนการของการย่อยสลายโปรตีนผ่านทาง UPS ประกอบไปด้วยขั้นตอนสองขั้นตอนคือ 1) การติดแท็กโปรตีนเป้าหมายด้วยโมเลกุลของ ubiquitin และ 2) การย่อยสลายโปรตีนเป้าหมายที่ติดแท็ก

ด้วย proteasome 26S complex (Glickman & Ciechanover, 2002) และต้องมีส่วนประกอบของเอนไซม์สามชนิดคือ E1 (ubiquitin activating enzyme), E2 (Ub-conjugating enzymes), และ E3 (ubiquitin protein ligase) ซึ่ง E3 เป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำต่อ substrate (Pickart CM, 2004) และมีการศึกษาพบว่ายีนสองยีนคือ atrogin-1 (muscle atrophy F-box) และ muscle ring finger 1 (MuRF1) เป็นยีนที่เข้ารหัสสำหรับ E3 (Bodine et al., 2001) โดยจะมีการแสดงออกเฉพาะในกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscles) และกล้ามเนื้อโครงร่าง (skeletal muscles) และทำหน้าที่ในการควบคุมการสลายตัวของกล้ามเนื้อ (Cao et al., 2005) ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของ atrogin-1 และ MuRF1 อาจเป็น maker ที่สามารถบ่งชี้ได้ว่ากล้ามเนื้อโครงร่างเกิดการสลายผ่านกระบวนการ UPS (Latres et al., 2005)

การศึกษาต่อมาก็แสดงให้เห็นว่า การถอดรหัสของ atrogin-1 และ MuRF1 ถูกควบคุมโดย insulin-like growth factor 1 (IGF-1)/Akt ซึ่งการควบคุมนี้จะขึ้นอยู่กับ signalling pathway [(Sandri et al., 2004); (Stitt et al., 2004)] นอกจากนี้แล้วแสดงให้เห็นว่า proinflammatory cytokine ได้แก่ tumor necrosis factor α (TNF α) และ reactive oxygen species (ROS) สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ atrogin-1 และ MuRF1 ได้ [(Y. P. Li, Chen, Li, & Reid, 2003); (Y. P. Li et al., 2005)]

จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า proinflammatory cytokine สามารถกระตุ้น Atrophy signaling ในกระบวนการเกิดการสลายตัวของกล้ามเนื้อได้ โดยกลไกการกระตุ้นนั้น TNF- α จะกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B (nuclear factor κ B) ซึ่งเป็น transcription factor ที่มีการกระตุ้นให้เกิดการสลายของกล้ามเนื้อ การกระตุ้น NF- κ B ทำให้เกิดการควบคุมการถอดรหัสและเกิดการแสดงออกของ MuRF1 ได้ และในส่วนของการแสดงออกของ atrogin-1 นั้นจะถูกกระตุ้นด้วย proinflammatory cytokine ต่างๆ เช่น IL-6 และ IL-10 โดยกระตุ้นการทำงานผ่าน MAPK p38 อีกทั้ง ROS ยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนทั้งสองนี้ได้เช่นกัน และยังพบว่า Fox-O ซึ่งเป็น transcription factor นั้นกระตุ้นทำให้เกิดการแสดงออกของ atrogin-1 และ MuRF1 โดยผ่านกระบวนการ UPS ได้ด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงนำไปสู่การสลายโปรตีนและส่งผลทำให้เกิดการสลายของกล้ามเนื้อต่อไป (Man, Kemp, Moxham, & Polkey, 2009) ดังภาพ 9



ภาพ 9 Muscle atrophy pathways

ที่มา: (Man et al., 2009)

บทบาทของ Glucocorticoids ในการเกิดการสลายตัวของโปรตีนกล้ามเนื้อ (Muscle degradation)

Glucocorticoids เป็นฮอร์โมนที่สร้างจากอะดรีนัลคอร์เทกซ์ของต่อมหมวกไต ฮอร์โมน glucocorticoids ที่สำคัญในร่างกายคน 3 ตัว คือ คอร์ติโซล (Cortisol) หรือ ไฮโดรคอร์ติโซล (Hydrocortisol) คอร์ติโซน (Cortisone) คอร์ติโคสเตอรอน (Corticosterone) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงสร้างเสริม และทำลายสารพวกโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตในร่างกาย เช่น ทำหน้าที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดให้สูง เพื่อให้เซลล์ต่างๆ ในร่างกาย มีน้ำตาลไว้ใช้ให้เพียงพอกับความต้องการและความจำเป็นในยามที่ร่างกายต้องการ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า glucocorticoids มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อ ความเข้มข้นในระดับสูงของ glucocorticoids ส่งผลให้การแสดงออกของกล้ามเนื้อฝ่อ โดยโปรตีนกล้ามเนื้อเกิดการสลายเพิ่มขึ้นผ่านกระบวนการทำงานของ ubiquitin proteasome system (UPS) ทำให้สูญเสียมวลกล้ามเนื้อ [(Hasselgren et al., 2010); (Tiao et al., 1996)] จากการศึกษาของ Tiao ได้ให้หลักฐานเพิ่มเติมว่า glucocorticoids นั้นมีบทบาทควบคุมการทำงานของ

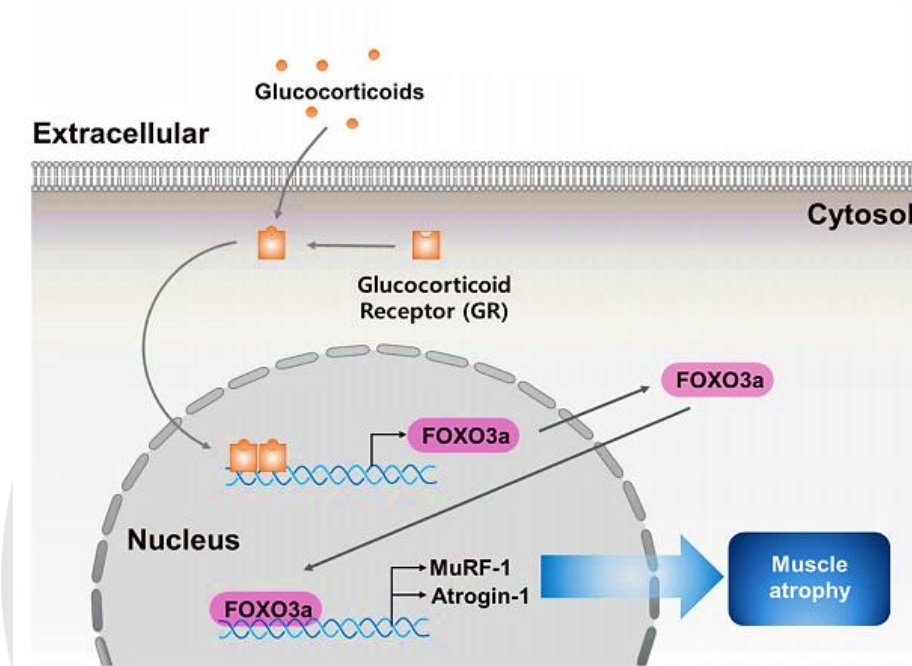
กระบวนการ UPS ในระดับต่างๆ ได้แก่ ubiquitin, เอนไซม์ต่างๆในกระบวนการทำงาน และ 26S proteasome (Tiao et al., 1996)

ซึ่งมีการศึกษามากมายได้ทำการเพาะเลี้ยง myotubes cell ด้วยการทรานส์เฟกต์กับ glucocorticoid เพื่อนำมาเป็นแบบจำลองของการสูญเสียกล้ามเนื้อในหลอดทดลอง ในการศึกษาส่วนใหญ่ L6 rat หรือ C2C12 mouse myotubes cells ถูกใช้เป็นโมเดลในการศึกษา โดยได้รับการทรานส์เฟกต์ด้วย dexamethasone ซึ่งยาในกลุ่มของ glucocorticoid ส่งผลให้การย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อและเกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ubiquitin ligases E3 ได้แก่ atrogin-1 และ MuRF1 เพิ่มขึ้น [(Stitt et al., 2004); (Evenson, Fareed, Menconi, Mitchell, & Hasselgren, 2005); (Latres et al., 2005); (Yang, Menconi, Wei, Petkova, & Hasselgren, 2005); (Marinovic, Zheng, Mitch, & Price, 2007)] การเปลี่ยนแปลงและ metabolism ของ myotubes cell ที่เกิดจาก dexamethasone จะมีลักษณะคล้ายกับการเปลี่ยนแปลงที่พบได้ในกล้ามเนื้อฝ่อในสัตว์ทดลอง (Tiao et al., 1996) และในผู้ป่วยที่มีภาวะกล้ามเนื้อฝ่อ [(Williams, Sun, Fischer, & Hasselgren, 1999); (Klaude et al., 2007)]

การศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของ atrogin-1 และ MuRF1 ถูกควบคุมโดยปัจจัยการถอดรหัสของ Forkhead box (FOX) O (FOXO) ได้แก่ FOXO1, FOXO3a, FOXO4 และ FOXO6 ซึ่ง FOXO มีการแสดงออกในกล้ามเนื้อโครงร่างและเป็นที่รู้จักกันทั่วไปสำหรับบทบาทของ FOXO ในภาวะกล้ามเนื้อลีบ โดยมี FOXO3a เป็นตัวควบคุมการทำงานของกระบวนการ UPS และกระบวนการ autophagy ในการเกิดการฝ่อของกล้ามเนื้อ [(Glass, 2003); (Sandri et al., 2004)] ในการทำงานของ UPS จะมี E3 ubiquitin ligases ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการถ่ายโอน ubiquitin จากเอนไซม์ ubiquitin-conjugating (E2) ไปยังโปรตีนเป้าหมาย ซึ่ง FOXO3a มีบทบาทสำคัญสำหรับการถอดรหัสของ E3 ubiquitin ligases ได้แก่ atrogin-1 และ MuRF-1 [(Bodine et al., 2001); (Jagoe, Redfern, Roberts, Gibson, & Goodship, 2002); (Sandri et al., 2004)] โดย MuRF-1 มีหน้าที่ในการส่งเสริมการเสื่อมสภาพของโปรตีนโครงสร้างของกล้ามเนื้อ ได้แก่ myosin heavy chains, actin, myosin-binding protein C และ troponin I [(Clarke et al., 2007); (Cohen et al., 2009)] ส่วน Atrogin-1 มีหน้าที่ในการส่งเสริมการลดลงของ eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) ซึ่งเป็น factor ในขั้นตอน translation ของโปรตีนในช่วงเริ่มต้น [(M. D. Gomes, Lecker, Jagoe, Navon, & Goldberg, 2001); (Lagirand-Cantaloube et al., 2008)]

จากที่กล่าวมาข้างต้นที่ว่า glucocorticoids มีบทบาทสำคัญในการเกิดการสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อ ซึ่งจากการศึกษาของ Kang และคณะในปี 2017 ก็ได้แสดงให้เห็นว่า glucocorticoids ส่งเสริมการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 ผ่านการกระตุ้นการแสดงออกของ FOXO3a โดย glucocorticoids เข้าจับกับ glucocorticoids receptor (GR) ที่อยู่ใน cytosol จากนั้น

glucocorticoids complex เข้าสู่นิวเคลียสและทำการจับกับ promoter ของ FOXO3a ทำให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ FOXO3a ส่งผลให้เกิดการส่งเสริมการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 ที่เพิ่มสูงขึ้น นำไปสู่การเกิดภาวะกล้ามเนื้อลีบ (muscle atrophy) ดังภาพ 10 ดังนั้น FOXO3a อาจเป็นเป้าหมายสำหรับการรักษาโรคกล้ามเนื้อลีบ (Kang SH, 2017)



ภาพ 10 Glucocorticoids กระตุ้นการเกิด Muscle atrophy
ที่มา: (Kang SH, 2017)

โปรตีนไฮโดรไลสเสท (protein hydrolysate)

โปรตีนไฮโดรไลสเสท คือผลผลิตของโปรตีนที่ได้จากการไฮโดรไลซิสโปรตีนโดยวิธีการต่างๆ เช่น กระบวนการทางเคมี การใช้จุลินทรีย์ และการใช้เอนไซม์โปรตีเอส [(Korhone H, 2006); (Saadia S, 2015)] โดยโมเลกุลของโปรตีนจะถูกตัดพันธะให้มีขนาดเล็กลงเป็นเปปไทด์หรือกรดอะมิโนอิสระ ดังนั้น โปรตีนไฮโดรไลสเสท จึงเป็นการผสมผสานระหว่างชนิด และความยาวของเปปไทด์ที่แตกต่างกัน ง่ายต่อการดูดซึมในทางเดินอาหาร ซึ่งในปัจจุบันนี้โปรตีน ไฮโดรไลสเสทจากสัตว์และพืช เป็นที่น่าสนใจมาก ตัวอย่างเช่น เปปไทด์ที่ได้มาจากการย่อยของโปรตีน ในสัตว์ เช่น ปลาคอด (cod) (Girgih et al., 2015) ไช้ (Liu J, et al., 2015) ขาหมูหมักเกลือ (Escudero, Mora, Fraser, Aristoy, & Toldrá, 2013) และเนื้อเป็ด (L. S. Wang, Huang, Chen, Huang, & Zhou, 2015) นอกจากนี้โปรตีนจากพืชก็เป็น แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีเช่นกัน เช่น เปปไทด์จากวอลนัท

(Chen, Yang, Sun, Niu, & Liu, 2012) เมล็ดถั่ว (López-Barrios, Gutiérrez-Urbe, & Serna-Saldivar, 2014) และกลูเตนจากข้าวโพด (Zhang et al., 2012)

วิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysate)

กระบวนการทางเคมี (Chemical Hydrolysis Process)

เป็นกระบวนการย่อยสลายทางเคมี โดยใช้สารละลายกรดหรือด่างในการตัดทำลายพันธะเปปไทด์ ซึ่งการใช้กรดหรือด่างที่สูงเกินไปนั้นทำให้กระบวนการทางเคมีไม่เป็นที่ยอมรับทางด้านนิเวศวิทยา นอกจากนี้ยังทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพทางโภชนาการและประสิทธิภาพในการทำงานลดลง เนื่องจากการย่อยสลายที่ไม่จำเพาะอาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการในกระบวนการนี้ ซึ่งการย่อยสลายของกรดอาจทำให้เกิดการ oxidizes กรดอะมิโน cysteine และ methionine และยังทำลายกรดอะมิโน serine และ threonine นอกจากนี้ การย่อยสลายของกรดอาจเปลี่ยน glutamine และ asparagine เป็น glutamate และ aspartate ตามลำดับ (Bucci, 2000) การสังเคราะห์โปรตีนไฮโดรไลเสทที่เกิดจากการย่อยสลายทางเคมีไม่สามารถทำซ้ำได้ เนื่องจากการใช้สารเคมีตัดทำลายพันธะเปปไทด์นั้นไม่จำเพาะเจาะจง จึงความแปรปรวนของกระบวนการสูง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพในระดับสูง ปัญหาเหล่านี้จึงเป็นข้อจำกัดของการใช้กระบวนการทางเคมีในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

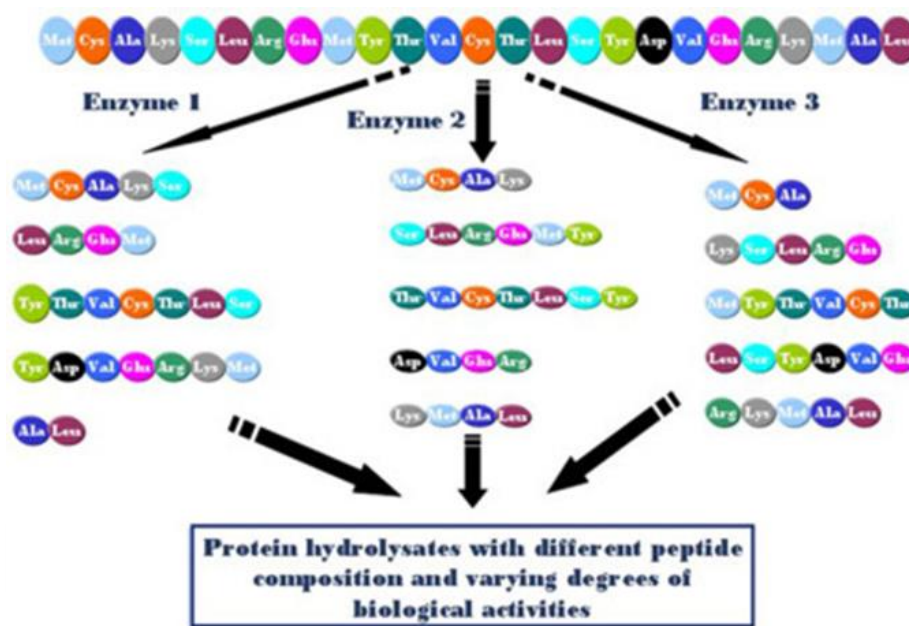
การใช้จุลินทรีย์ในการผลิต (Microbial Fermentation)

เป็นกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์ในการหมัก ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าในระหว่างกระบวนการเจริญเติบโตของเชื้อ เชื้อจะหลั่ง proteolytic enzymes ออกมาเพื่อย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์ ดังนั้นจึงสามารถสร้าง bioactive peptides ในระหว่างการหมักได้ (Castellano et al, 2013) วิธีการหมักโดยใช้ที่มีจุลินทรีย์ยังเป็นกระบวนการหนึ่งในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทในระดับอุตสาหกรรม ข้อดีของการใช้จุลินทรีย์คือโปรตีนจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ที่ผลิตออกมาและสามารถนำเปปไทด์ไปทำบริสุทธิ์ต่อได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการย่อย อย่างไรก็ตามข้อเสียของกระบวนการใช้จุลินทรีย์คือให้ผลผลิตในปริมาณที่ต่ำ

กระบวนการทางเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)

เป็นกระบวนการย่อยสลายโปรตีนโดยอาศัยเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส (Protease) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท (Kristinsson & Rasco, 2000) เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการทางเคมี กระบวนการทางเอนไซม์เป็นวิธีการที่เหมาะสมและดีกว่า เนื่องจากสามารถควบคุมการย่อยสลายของเอนไซม์ได้ เหมาะสมกับอุตสาหกรรมอาหารและยา เนื่องจากการ

ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์หรือสารเคมีที่เป็นพิษ (Kim et al., 2010) นอกจากนี้เมื่อเทียบกับกระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์แล้ว กระบวนการย่อยของเอนไซม์สามารถผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่แตกต่างกันได้ เนื่องจากสามารถใช้กลุ่มของเอนไซม์โปรตีเอสและสัดส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นที่แตกต่างกันได้ ดังภาพ 12



ภาพ 11 การตัดของเอนไซม์ที่แตกต่างกันและให้โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ต่างกัน

ที่มา: (M. Nasri, 2017)

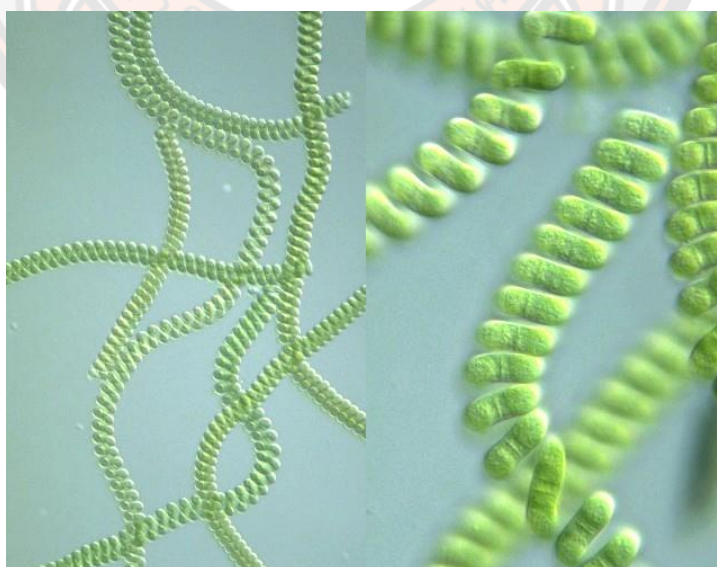
ประโยชน์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทและไบโอแอคทีฟเปปไทด์ (Bioactive peptides)

ปัจจุบันโปรตีนไฮโดรไลเสทถูกนำมาใช้ประโยชน์ เช่น เป็นส่วนผสมในอาหารทำให้ช่วยลดการแพ้โปรตีนในอาหารลงได้ ใช้เพื่อป้องกันหรือรักษาโรค ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคอ้วน และโรคมะเร็ง นอกจากนี้ ยังมีคุณสมบัติทางชีววิทยาต่างๆ เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Udenigwe & Aluko, 2012) คุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Salampessy, 2009) ลดความโลหิตสูง (He, Liu, & Ma, 2013) ใช้เป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือด (R. Nasri & Nasri, 2013) ลดระดับคอเลสเตอรอล [(Lassoued et al., 2014); (Udenigwe & Rouvinen-Watt, 2015)] ช่วยลดน้ำตาลในกระแสเลือด (R. Nasri et al., 2015) และต้านมะเร็งได้ (Xue et al., 2012) และมีการรายงานผลการวิจัยพบว่า bioactive peptides ซึ่งเป็นเปปไทด์สายสั้น ที่ถูกผลิตโดยกระบวนการย่อยสามารถถูกดูดซึมได้ที่ลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการทำงานของระบบร่างกาย จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน

ไฮโดรไลเซส [(Sayari et al., 2016); (Q. Wang et al., 2016)] โดยปกติจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 2-20 ตัวต่อ 1 โมเลกุล แต่ในบางกรณีอาจประกอบด้วยกรดอะมิโนมากกว่า 20 ตัวก็ได้ (Erdmann, Cheung, & Schröder, 2008) ขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโน เปปไทด์เหล่านี้มีการทำงานที่แตกต่างกันไป เช่น จับกับแร่ธาตุ ด้านเชื้อจุลชีพ ด้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Coscueta et al., 2016) ได้มีงานวิจัยออกมาว่า เปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำๆ (<10 kDa) มีประสิทธิภาพในด้านการต้านอนุมูลอิสระและลดอาการแพ้ลงได้มากกว่าเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลสูงๆ (García-Tejedor et al., 2014) ; (Ruiz-Ruiz J, 2013)]

Arthrospira platensis

A. platensis หรือสาหร่ายเกลียวทอง จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae) เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) ช่วยในการสังเคราะห์แสง หรืออาจเรียกได้อีกอย่างว่าเป็นแบคทีเรียประเภทไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอต (Prokaryote) คือไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear membrane) มีเยื่อหุ้มเซลล์เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) มีแวคิวโอล (Vacuole) ขนาดใหญ่ ทำให้ลอยน้ำได้ ขนาดความยาวประมาณ 300-500 ไมโครเมตร ความกว้างประมาณ 8 ไมโครเมตร มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction) โดยการขาดออกเป็นท่อนๆ (Fragmentation) และท่อนที่ขาดนี้สามารถแบ่งเซลล์ใหม่ได้ ดังภาพ 13



ภาพ 12 ลักษณะรูปร่างของสาหร่าย *A. platensis*

(ที่มา: <http://todoproductividad.blogspot.com> สืบค้นเมื่อวันที่ 8/10/2561)

คุณสมบัติที่เด่นของสาหร่ายชนิดนี้ คือสามารถอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีความเป็นด่างสูง มีค่า pH 10 ± 1 ซึ่งสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเจริญอยู่ได้ค่อนข้างยาก ในทางอุตสาหกรรมนั้นนิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา เพราะมีคุณค่าทางอาหารสูง อุดมไปด้วยโปรตีนสูงถึง 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต วิตามิน เกลือแร่ เบต้าแคโรทีน และกรดไขมันจำเป็น (Pyne SK et al., 2016) ดังตาราง 2 และที่สำคัญมีรายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ที่ได้จากกระบวนการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเสทของ *A. platensis* มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) สูง โดยมี % DPPH scavenging activity สูงถึง 81.44 ± 0.43 ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีฤทธิ์เทียบเท่ากับ glutathione ($82.63 \pm 0.56\%$) และสามารถกำจัด superoxide anion hydroxyl free radical และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ SOD ได้ (Yu et al., 2016)

ตาราง 2 องค์ประกอบของสาหร่าย *A. platensis* (Pyne PK, 2017)

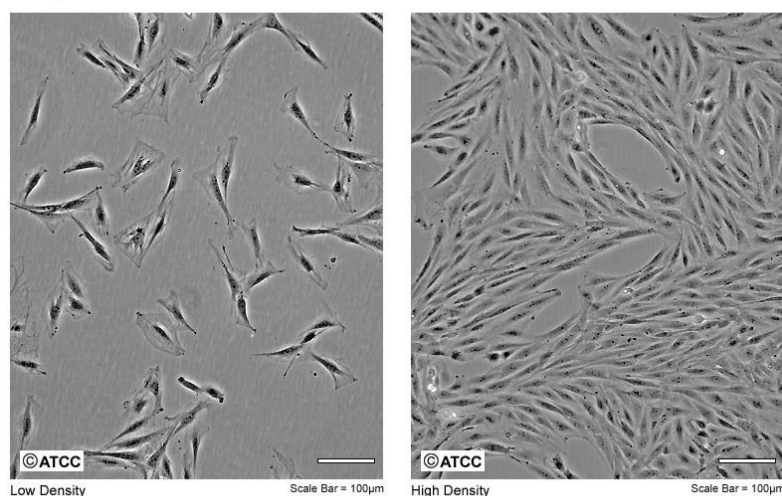
Amino acids	g/100 g
- Leucine	4.94
- Valine	3.51
- Isoleucine	3.20
- Tryptophan	0.93
- Methionine	1.15
- Phenylalanine	2.78
- Threonine	2.97
- Lysine	3.02
Vitamins	mg 100 g ⁻¹
- Carotene	140
- Vitamin E	100
- Thiamin B1	3.5
- Riboflavin	4
- Niacin	14
- Vitamin B12	0.32
- Folic acid	0.01
- Biotin	0.005

- Vitamin K	2.2
Carbohydrates	mg 100 g⁻¹
- Glucose	54.4
- Rhamnose	22.3
- Mannose	9.3
- Xylose	7.0
- Galactose	2.6
Lipids	g 100 g⁻¹
- Palmitic	2
- Gamma linolenic (GLA)	1
- Arachidic	0.048
- Oleic	0.017
- Myristic	0.041
Minerals	mg 100 g⁻¹
- Zinc	3
- Sodium	900
- Potassium	1400
- Phosphorus	800
- Manganese	5
- Magnesium	400
- Iron	100
- Copper	1.2
- Calcium	700
Phytonutrients	g/100 g⁻¹
- Cis beta-carotene	0.073
- Trans beta-carotene	0.26
- Phycocyanin	12
- Chlorophyll-a	1

L6 skeletal muscle cell

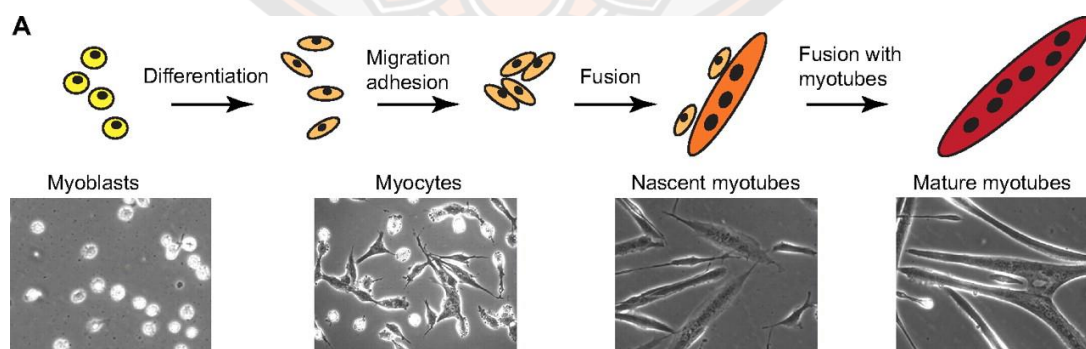
L6 skeletal muscle cell ที่ใช้ในการทดลองได้มาจากหนูสายพันธุ์ *Rattus norvegicus* เป็นเนื้อเยื่อชนิดกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle) ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์ชนิด myoblast ดังภาพ 14 โดยในการเพาะเลี้ยงจะทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงให้เป็น myotube ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยและมีนิวเคลียสหลายนิวเคลียส ดังภาพ 15 และได้การรองรับความปลอดภัยทางชีวภาพตามหลักเกณฑ์ของ U.S. Public Health Service Guidelines

ATCC Number: **CRL-1458**
Designation: **L6**



ภาพ 13 L6 myoblast cell

ที่มา: <https://www.atcc.org> สืบค้นเมื่อวันที่ 13/10/2561



ภาพ 14 การ differentiation จากเซลล์ L6 myoblast cell เป็น myotube cell

ที่มา: <http://dev.biologists.org> สืบค้นเมื่อวันที่ 16/10/2561

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

ชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

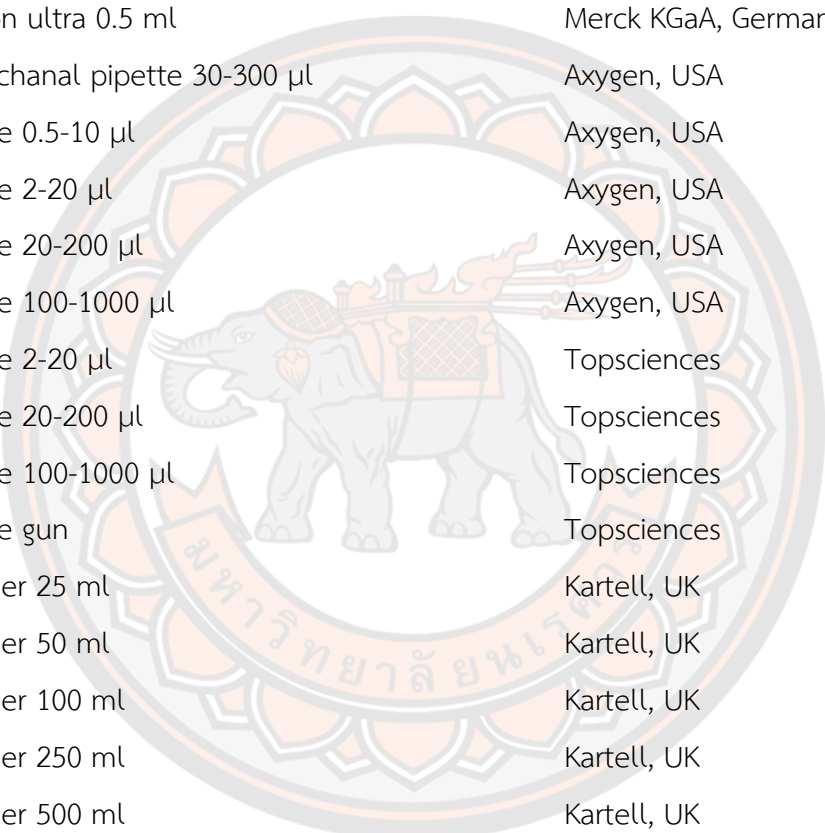
เซลล์เพาะเลี้ยง L6 rat skeletal muscle cell (JCRB9081)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ	บริษัทที่ผลิต
5% CO ₂ incubator	SANYO, Japan
Lamina flow hood	FASTER, BHA72
Inverted microscope	OLYMPUS, Japan
Neubauer hemocytometer	BOECO, Germany
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad
Refrigerated centrifuge	Hettich
Molecular image gel documentation system	GE healthcare, Life science
Nanodrop	Thermo scientific, USA
Microplate reader	BIOTEK
Electrophoresis power supply	ADVANCE
Agarose gel electrophoresis apparatus	ADVANCE
Hotplate Stirrer	Fisher Scientific, USA
Vortex V-1 plus	Biosan, USA
Mixer Uzusio VTx-3000L	Laboratory & Medical supplies,
Mini centrifuge	Cubee gene reach,

วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุ	บริษัทที่ผลิต
Centrifuge tube 15 ml	SPL Life Sciences, Korea
Centrifuge tube 50 ml	SPL Life Sciences, Korea
Tissue culture dish	SPL Life Sciences, Korea
Cell culture flask T25	SPL Life Sciences, Korea



6-wells plate for cell culture	SPL Life Sciences, Korea
96-wells plate for cell culture	SPL Life Sciences, Korea
Microcentrifuge tube 1.5 ml	KIRGEN, China
0.2 ml PCR tube	KIRGEN, China
10 µl tips	KIRGEN, China
200 µl tips	KIRGEN, China
1000 µl tips	KIRGEN, China
Amicon ultra 0.5 ml	Merck KGaA, Germany
Multi channel pipette 30-300 µl	Axygen, USA
Pipette 0.5-10 µl	Axygen, USA
Pipette 2-20 µl	Axygen, USA
Pipette 20-200 µl	Axygen, USA
Pipette 100-1000 µl	Axygen, USA
Pipette 2-20 µl	Topsciences
Pipette 20-200 µl	Topsciences
Pipette 100-1000 µl	Topsciences
Pipette gun	Topsciences
Cylinder 25 ml	Kartell, UK
Cylinder 50 ml	Kartell, UK
Cylinder 100 ml	Kartell, UK
Cylinder 250 ml	Kartell, UK
Cylinder 500 ml	Kartell, UK
Cylinder 1000 ml	Kartell, UK
Duran 250 ml	Shcott, USA
Duran 500 ml	Schott, USA
Duran 1000 ml	Schott, USA
Hypodermic needle	Nipro, Japan
Disposable syringe	Nipro, Japan
Filter paper 47 mm	Macherey-nagel, UK
Syringe filter 25 mm/0.45 µm	Pall corporation, USA
Serological 10 ml	SPL Life Sciences, Korea

Black plate	SPL Life Sciences, Korea
Cryovial 1.8 ml	SPL Life Sciences, Korea

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Cell culture	
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco, USA
Fetal bovine serum	Capricorn Scientific, Germany
Penicillin-Streptomycin solution (100X)	Capricorn Scientific, Germany
Trypsin-EDTA Solution 0.5% (10X)	Caisson LABS, USA
L-Glutamine (10X)	Caisson LABS, USA
Trypan blue stain (0.4%)	Bio Basic Canada Inc, Canada
Phosphate Buffered Saline	Bio Basic Canada Inc, Canada
MTT reduction assay	
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Bio Basic Canada Inc, Canada
Trypanblue	Bio Basic Canada Inc, Canada
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide)	Thermo Scientific, USA
Gene expression (RT-PCR)	
Econo [®] Tag plus green 2x master mix	Lucigen, USA
TGE buffer 25x solution	Bio Basic Canada Inc, Canada
Agarose A powder	Bio Basic Canada Inc, Canada
5xRT Master mix II	Toyobo, Japan
4xDN Master mix	Toyobo, Japan
100bp DNA ladder	GeneDirex, USA
Novel juice	GeneDirex, USA
Ethanol	RCI LAB-SCAN, Thailand
Isopropanol	RCI LAB-SCAN, Thailand

Chloroform	RCI LAB-SCAN, Thailand
Nuclease-free water	Thermo Scientific, USA
RiboZal RNA extraction reagent	VWR life science,
Methyl alcohol	Tedia company,
SOD1 primer	Bio Basic Canada Inc, Canada
GPx1 primer	Bio Basic Canada Inc, Canada
CAT primer	Bio Basic Canada Inc, Canada
Atrogin-1 primer	Bio Basic Canada Inc, Canada
MuRF1 primer	Gene wiz,

Algae culture

NaHCO_3	Ajax finechem,
NaNO_3	LOBAL Chemie, India
NaCl	LOBAL Chemie, India
K_2HPO_4	LOBAL Chemie, India
K_2SO_4	LOBAL Chemie, India
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Ajax finechem,
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	LOBAL Chemie, India
CaCl_2	Ajax finechem,
MgCl_2	Ajax finechem,
H_3BO_3	Ajax finechem,
MoO_3	Ajax finechem,
MnCl_2	Ajax finechem,
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	LOBAL Chemie, India
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	LOBAL Chemie, India
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Ajax finechem,
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	LOBAL Chemie, India
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Chem-supply,
NH_4VO_3	Merck KGaA, USA

Protein extraction and hydrolysis

NaH ₂ PO ₄	Fisher Scientific, USA
Na ₂ HPO ₄	Fisher Scientific, USA
Bradford reagent	Bio Basic Canada Inc, Canada
Lowry's reagent	Bio Basic Canada Inc, Canada
Protease from <i>Bacillus licheniformis</i> (Alcalase)	Sigma-Aldrich, USA

Antioxidant activity

ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogen peroxide	Merck KGaA, USA
DCFH-DA (2'-7'-dichlorofluorescein diacetate)	Sigma-Aldrich, USA
Dexamethasone	Sigma-Aldrich, USA

วิธีดำเนินงานวิจัย

การเพาะเลี้ยงสาหร่าย *A. platensis*

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *A. platensis* ในสูตรอาหาร Zarrouk's medium ที่มีความเข้มข้นเกลือเท่ากับ 0.017 M NaCl โดยมีองค์ประกอบดังตาราง 3 จากนั้นเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรเพื่อการเจริญเติบโต

ตาราง 3 องค์ประกอบในสูตรอาหาร Zarrouk's medium (Greque de Morais, 2015)

สาร	กรัมต่อลิตร (g/L)
NaNO ₃	2.50 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
K ₂ SO ₄	1.00 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20 g
NaCl	1.00 g
CaCl ₂	0.04 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g

Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.08 g
สารละลาย A5	(1 มิลลิลิตรต่อลิตร)
สารละลาย B6	(1 มิลลิลิตรต่อลิตร)

หมายเหตุ: สารละลาย A5 (2.86 g H₃BO₃, 1.80 g MnCl₂·4H₂O, 0.22 g ZnSO₄·7H₂O, 0.08 g CuSO₄·5H₂O and 0.018 g MoO₃)

สารละลาย B6 (0.023 g NH₄VO₃, 0.048 g NiSO₄·7H₂O, 0.018 g Na₂WO₄·2H₂O and 0.044 g Co(NO₃)₂·6H₂O)

สกัดโปรตีนจากสาหร่าย *A. platensis*

ทำการเก็บเซลล์สาหร่ายมาทำการตกตะกอนเซลล์โดย vacuum pump เติม 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.8 (20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄) ทำการ freeze เซลล์ที่ -20 °C เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นทำการ thaw เซลล์ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วปั่นตกตะกอนที่ 5000 rpm ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็น supernatant ไปทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay และนำโปรตีนที่ได้ไปทำการผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสทในขั้นตอนต่อไป

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย *A. platensis*

นำโปรตีนมาทำการเติม 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.8 (20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄) จากนั้นทำการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ alcalase ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) นำไปบ่มไว้ที่ 50 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็น supernatant ไปทำการกรอง (cut-off) ผ่าน amicon ultra centrifugal filters ขนาด 10 kDa จากนั้นนำไปหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lawry's method และนำโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้ไปทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและกระตุ้นการสร้างโปรตีนกล้ามเนื้อในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย *A. platensis* ด้วยวิธี ABTS assay

ทำการเตรียมสารละลาย ABTS โดยนำไปปรับความเข้มข้นให้ได้ค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 nm จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลเสทมาปรับความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, และ 300 µg/ml ใส่ลงใน 96 well plate ปริมาตร 50 µl/well แล้วเติม

สารละลาย ABTS ลงไป 150 $\mu\text{L}/\text{well}$ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm และรายงานผลเป็น % ABTS free radical scavenging โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์

$$\% \text{ ABTS free radical scavenging} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม} - \text{กลุ่มทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์กลุ่มควบคุม}} \times 100$$

การเพาะเลี้ยงและการ Differentiation ของ L6 Rat skeletal muscle cell

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ L6 ใน complete media (1X DMEM, 10% FBS) โดยเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม (5% CO_2 , อุณหภูมิ 37 °C) จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตและมี %Confluent ประมาณ 60-80% จึงทำการ differentiation เซลล์โดยทำการ seed เซลล์ลงใน 24 well plate (5000 cells/well) เพาะเลี้ยงใน complete media ที่มี 10% FBS เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารโดยใช้ complete media ที่มี 2% FBS เพาะเลี้ยงจนได้ %Confluent ประมาณ 70-80% จากนั้นจึงนำเซลล์ที่ได้ไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

การศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของ hydrogen peroxide (H_2O_2) ใน L6 Rat skeletal muscle cell

1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วย MTT assay

นำเซลล์ L6 ที่ได้หลังจากทำการ differentiation โดยมี %confluent ประมาณ 70-80% มาทำการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้น 0-1,250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ บ่มทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเติมสารละลาย MTT ลงไปปริมาตร 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ บ่มไว้ในตู้ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการละลายผลึก formazan โดยการเติมสารละลาย DMSO ลงไป 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ บ่มไว้ในตู้ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่า OD 570 nm จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปหา ค่า IC_{50}

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ H_2O_2 ด้วย MTT assay

นำเซลล์ L6 ที่ได้หลังจากทำการ differentiation โดยมี %confluent ประมาณ 70-80% มาทำการเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0-1400 μM หลังจากนั้นทำการเติมสารละลาย MTT ลงไป ปริมาตร 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ บ่มไว้ในตู้ 5 % CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการละลายผลึก formazan โดยการเติมสารละลาย DMSO ลงไป 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ บ่มไว้ในตู้ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่า OD 570 nm จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปหาค่า IC_{50} และ นำความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3. การทดสอบคุณสมบัติในป้องกันเซลล์จาก H_2O_2 ของโปรตีนไฮโดรไลเซสในเซลล์ L6

Rat skeletal muscle

นำเซลล์ L6 ที่ได้หลังจากทำการ differentiation โดยมี %confluent ประมาณ 70-80% มาทำการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มไว้ในตู้ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 800 μM บ่มไว้ในตู้ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และตรวจสอบดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และดูลักษณะและรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะปกติ

4. การทดสอบคุณสมบัติในการลดความเป็นพิษของ H_2O_2 ของโปรตีนไฮโดรไลเซสในเซลล์

L6 Rat skeletal muscle

นำเซลล์ L6 ที่ได้หลังจากทำการ differentiation โดยมี %confluent ประมาณ 70-80% มาทำการเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 800 μM บ่มไว้ในตู้ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มไว้ในตู้ CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจสอบดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และดูลักษณะและรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะปกติ

การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการลดระดับการสะสมของอนุมูลอิสระ ภายในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ด้วยวิธี DCFH-DA assay

1. การทดสอบแบบ Co-treatment

นำเซลล์ L6 ที่ผ่านการ differentiation และมี % confluence ประมาณ 70-80% มาทำการศึกษา โดยในการทดสอบจะแบ่งเป็น 4 สภาวะดังนี้ สภาวะที่ 1 คือกลุ่มควบคุมซึ่งเลี้ยงในอาหาร complete medium สภาวะที่ 2 คือสภาวะกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 800 μM สภาวะที่ 3 กลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซส 750 $\mu g/ml$ ร่วมกับ H_2O_2 800 μM สภาวะที่ 4 คือกลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซส 750 $\mu g/ml$ เมื่อแบ่งกลุ่มและเติมสารตามที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำการบ่มในสภาวะที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย 10X PBS แล้วทำการเติมสารละลาย 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ที่ความเข้มข้น 100 μM ลงไป บ่มในสภาวะที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น Excitation 495 nm และ Emission 529 nm (Xie et al., 2017)

2. การทดสอบแบบ Protection

นำเซลล์ L6 ที่ผ่านการ differentiation และมี % confluence ประมาณ 70-80% มาทำการศึกษา โดยในการทดสอบจะแบ่งเป็น 4 สภาวะดังนี้ สภาวะที่ 1 คือกลุ่มควบคุมซึ่งเลี้ยงในอาหาร complete medium สภาวะที่ 2 คือสภาวะกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 800 μM สภาวะที่ 3 กลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซต 750 $\mu g/ml$ ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงเติม H_2O_2 800 μM สภาวะที่ 4 คือกลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซต 750 $\mu g/ml$ เมื่อแบ่งกลุ่มและเติมสารตามที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำการบ่มในสภาวะที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย 10X PBS แล้วทำการเติมสารละลาย 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ที่ความเข้มข้น 100 μM ลงไป บ่มในสภาวะที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น Excitation 495 nm และ Emission 529 nm 100 μM ลงไป บ่มในตู้ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง fluorescent ที่ความยาวคลื่น Excitation : 495 และ Emission : 529 (Wu et al., 2014)

การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบ

ด้านอนุมูลอิสระในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle

นำเซลล์ L6 ที่ได้หลังจากทำการ differentiation โดยมี %confluent ประมาณ 70-80% มาทำการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มไว้ในตู้ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์มาสกัด total RNA วัดความเข้มข้น หาค่าความบริสุทธิ์ แล้วนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA ก่อนนำไปศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับ mRNA ของ Superoxide dismutase 1 (SOD1), Glutathione peroxidase 1 (GPx1) และ Catalase (CAT) ดังตาราง 4 หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดย agarose gel electrophoresis

การศึกษาผลของโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อการแสดงออกของยีนในระบบด้านอนุมูลอิสระในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน

นำเซลล์ L6 ที่ได้หลังจากทำการ differentiation โดยมี %confluent ประมาณ 70-80% มาทำการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มไว้ในตู้ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด oxidation โดยการเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 150 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์มาสกัด total RNA วัดความเข้มข้น หาค่าความบริสุทธิ์ แล้วนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA ก่อนนำไปศึกษาการแสดงออกในระดับ mRNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับ mRNA ของ

Superoxide dismutase 1 (*SOD1*), Glutathione peroxidase 1 (*GPx1*) และ Catalase (*CAT*) ดังตาราง 4 หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดย agarose gel electrophoresis

ตาราง 4 แสดงลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *SOD1*, *GPx1* และ *CAT*

Genes		Primer sequence (5'→3')	PCR product	Annealing temperature
SOD1	F	5'-AATGTGTCCATTGAAGATCGTGTGA-3'	118 bp	60
	R	5'-GCTTCCAGCATTTCCAGTCTTTGTA-3'		
GPx1	F	5'-AGTTCGGACATCAGGAGAATGGCA-3'	125 bp	62
	R	5'-TCACCATTACCTCGCACTTCTCA-3'		
CAT	F	5'-GCAGGAAGACTTGACAGGA-3'	133 bp	58
	R	5'-ATGGGAAGGTTTCTGCCTCC-3'		

หมายเหตุ: F = Forward primer, R = Reverse primer

การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสเทในการลดระดับการแสดงออกของยีน Muscle atrophy F-box (*Atrogin-1*) และ Muscle ring finger 1 (*MuRF1*) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle

นำเซลล์ L6 ที่ได้หลังจากทำการ differentiation โดยมี %confluent ประมาณ 70-80% มาทำการศึกษา โดยทำการเติมโปรตีนไฮโดรไลสเทที่ความเข้มข้น 750 µg/ml บ่มไว้ในตู้ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ L6 ที่ผ่านการ differentiation และมี % confluence ประมาณ 70 - 80% มาทำการเติมโปรตีนไฮโดรไลสเทที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มไว้ในตู้ CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำลองการเกิดสภาวะ muscle wasting ด้วยการเติม Dexamethasone ที่ความเข้มข้น 1 µM บ่มไว้ในสภาวะที่มี 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้มาทำการสกัด total RNA จากนั้นทำการเก็บเซลล์มาสกัด total RNA วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วย Nanodrop Spectrophotometer แล้วนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยวิธี reverse transcription ก่อนนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะกับ mRNA ของ atrogin-1 และ MuRF1 ดังตาราง 5 หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ตาราง 5 แสดงลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *MuRF1* และ *Atrogin-1*

Genes		Primer sequence (5'→3')	PCR	Annealing
			product	temperature
MuRF1	F	5'-CGACTCCTGCCG AGTGACC-3'	69 bp	55
	R	5'-GCGTCAAACTTGTGGCTAG-3'		
Atrogin-1	F	5'-CCAGCTGGATTGGAAGAAGAT-3'	101 bp	60
	R	5'-GAGATTGTGGCAGTGT-3'		

หมายเหตุ: F= Forward primer, R= Reverse primer

วิธีการสกัด RNA ของเซลล์ Rat L6 skeleton muscle cell (L6 cell)

ทำการแตกเซลล์โดยการใส่ Ribozol™ RNA Extraction reagent (AMRESCO®) 200 µl ในเพลทชนิด 24 หลุมที่มีเซลล์กล้ามเนื้อเลี้ยงเป็นเวลา 5-6 วัน จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารขึ้น-ลงจนเซลล์หลุดออกจากเพลททั้งหมดและนำมาใส่หลอดทดลอง 1.5 ml จากนั้นผสมสารให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมนสารละลายคลอโรฟอร์ม 40 µl เพื่อตกตะกอน DNA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง 12,000 x g 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่และเติมนสารละลายไอโซโพรพานอล 200 µl เพื่อตกตะกอน RNA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง 12,000 x g 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนออกทั้งหมดให้เหลือแต่ตะกอน RNA และทำการล้างตะกอนด้วย 75% Ethanol 600 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 x g 5 นาทีและนำส่วนใสออกทั้งหมด ทิ้งให้ตะกอนแห้ง จากนั้นละลายตะกอน RNA ด้วย Water RNase Free 25 µl นำไปวัดค่าความบริสุทธิ์ของสารสกัดที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตรและค่าการปนเปื้อนของเกลือที่ความยาวคลื่น 260/230 นาโนเมตร

ขั้นตอนการเตรียม cDNA

เตรียม cDNA จาก RNA ที่สกัดได้โดยใช้ชุด Kit “Revertra Ace® qPCR RT Master mix with gDNA Remover” ทำการเตรียมสาร 4X DN Master Mix (1 µl gDNA Remover solution และ 50 µl 4X RT Master Mix) จากนั้นทำการเตรียม DNase I reaction ดังนี้ 4X DN Master Mix 2 µl, RNA template 500 ng และปรับปริมาตรด้วย Nuclease – free water ให้ได้ 8 µl ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที ต่อมาทำการเตรียม cDNA โดยการเติม 5X RT Master

Mix II 2 μ l และนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 °C 15 นาที, 50 °C 5 นาที และ 98 °C 5 นาที ตามลำดับ ทำการวัดค่าความเข้มข้นของ DNA เพื่อนำไปวัดค่าความบริสุทธิ์ของสารสกัดที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตรและค่าการปนเปื้อนของเกลือที่ความยาวคลื่น 260/230 นาโนเมตร จากนั้นทำการเก็บ cDNA อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Polymerase chain reaction (PCR)

นำ cDNA มาทำเป็น DNA Template โดยจะดูการแสดงของยีนทั้งหมด 5 ยีน ได้แก่ *SOD1*, *GPx1*, *CAT*, *Atrogin-1* และ *MuRF1* โดยนำมาทำปฏิกิริยากับสารเคมีดังแสดงในตาราง 6-8 ดังต่อไปนี้

ตาราง 6 PCR reaction สำหรับ *SOD1*, *GPX1*, *CAT*, *Artogin-1*

PCR component	1 Reaction (μ l)
2X master mix	6.25
H ₂ O	4.75
Primer F (10 μ M)	0.5
Primer R (10 μ M)	0.5
DNA template (cDNA)	0.5
Total	12.5

ตาราง 7 PCR reaction สำหรับ *MuRF1*

PCR component	1 Reaction (μ l)
2X master mix	6.25
H ₂ O	3.75
Primer F (10 μ M)	1
Primer R (10 μ M)	1
DNA template (cDNA)	0.5
Total	12.5

ตาราง 8 PCR condition สำหรับ *SOD1*, *GPX1*, *CAT*, *Atrogin-1* และ *MuRF1*

Conditions	Guidelines
Pre – Denaturation	94°C 5 min
Denaturation	94°C 30 s
Annealing	Temp <i>SOD1</i> : 60°C <i>GPx1</i> : 62°C <i>CAT</i> : 58°C <i>Atrogin-1</i> : 60°C <i>MuRF1</i> :55°C Time : 30 s
Extension	94°C 30 s
Number of Cycles	30 cycles
Final Extension	94°C 7 min

ขั้นตอนต่อไปได้นำ cDNA มาทำ control โดยจะใช้ β -Actin เป็นตัว control ดังแสดงใน
 ตาราง 9 -10

ตาราง 9 PCR reaction สำหรับ β -Actin

PCR component	1 Reaction (μ l)
2X master mix	12.5
H ₂ O	11
Primer F (10 μ M)	0.25
Primer R (10 μ M)	0.25
DNA template (cDNA)	1
Total	25

ตาราง 10 PCR condition สำหรับ β -Actin

Conditions	Guidelines
Pre - Denaturation	95°C 2 min
Denaturation	94°C 30 s
Annealing	58°C 1 min
Extension	94°C 1 min
Number of Cycles	30 cycles
Final Extension	94°C 5 min

หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ภาพโดยใช้โปรแกรม Image J โดยนำผล PCR ที่ run gel electrophoresis มาทำการวิเคราะห์ภาพเพื่อวัดค่าความแตกต่างของแต่ละแบนโดยใช้โปรแกรม Image J

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

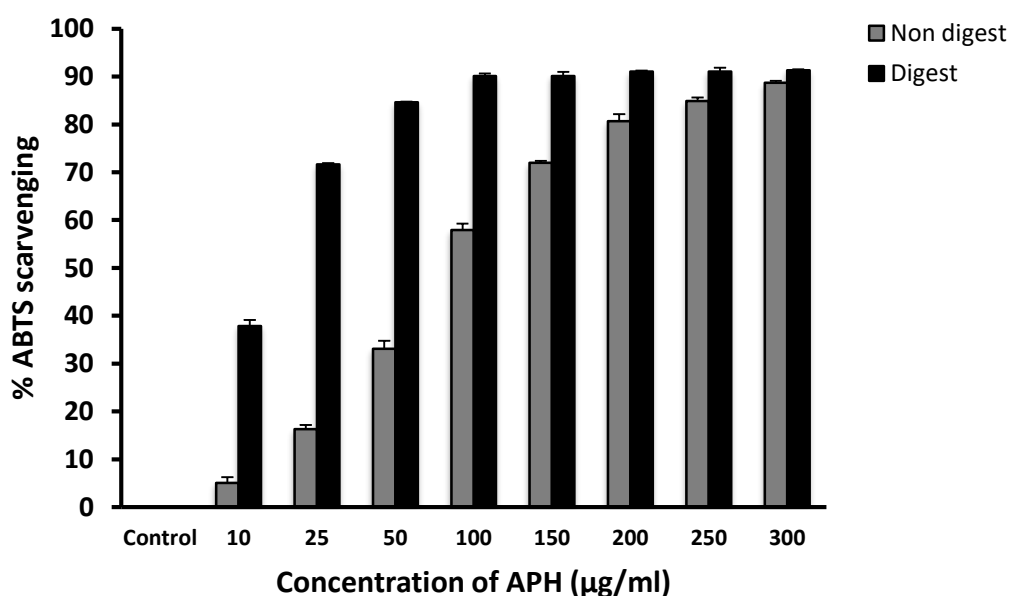
ทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้ student T-TEST และ one way analysis of variance (ANOVA) เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย $p < 0.05$ ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard error; SE) ($n=3$)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย *Arthrospira platensis* ด้วยวิธี ABTS assay

ทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย *A. platensis* ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ alcalase โดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, และ 300 µg/ml ด้วยวิธี ABTS และรายงานผลเป็น % ABTS free radical scavenging ผลการทดลองพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย *A. platensis* ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ alcalase มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อสังเกตจากค่า % ABTS free radical scavenging เปรียบเทียบกับโปรตีนจากสาหร่ายที่ไม่ได้ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ alcalase และยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสทสูงขึ้น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระก็เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ โดยพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้น 100, 150, 200, 250 และ 300 µg/ml มีค่า % ABTS free radical scavenging เท่ากับ 90.10 ± 0.53 , 90.10 ± 0.86 , 91.04 ± 0.18 , 91.04 ± 0.82 และ 91.31 ± 0.23 ตามลำดับ ดังที่แสดงในภาพ 15

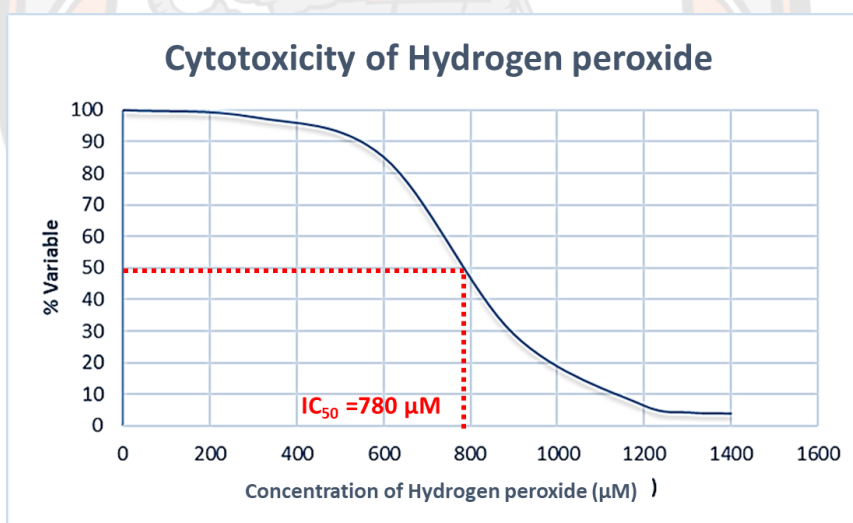


ภาพ 15 กราฟแสดงผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย *A. platensis* ด้วยวิธี ABTS (Mean±SD)

คุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ hydrogen peroxide (H_2O_2) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle cell ของโปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่าย *A. platensis*

ความเป็นพิษต่อเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ของ hydrogen peroxide (H_2O_2)
(Unpublished data, Sirikan Pongnan)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ของ H_2O_2 ทำโดยนำเซลล์ L6 ที่ผ่านการ differentiation และมี % confluence 70 - 80% มาเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0-1400 μM บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay และนำข้อมูลที่ได้ไปหาค่า IC_{50} ผลการทดลองแสดงดังภาพ 16 แสดงให้เห็นถึงอัตราการรอดชีวิตหลังจากได้รับ H_2O_2 พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ H_2O_2 นั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณที่ได้รับ โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 780 μM H_2O_2 ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลง 50% ดังนั้นเราจึงใช้ความเข้มข้น 800 μM สำหรับการศึกษาต่อไป

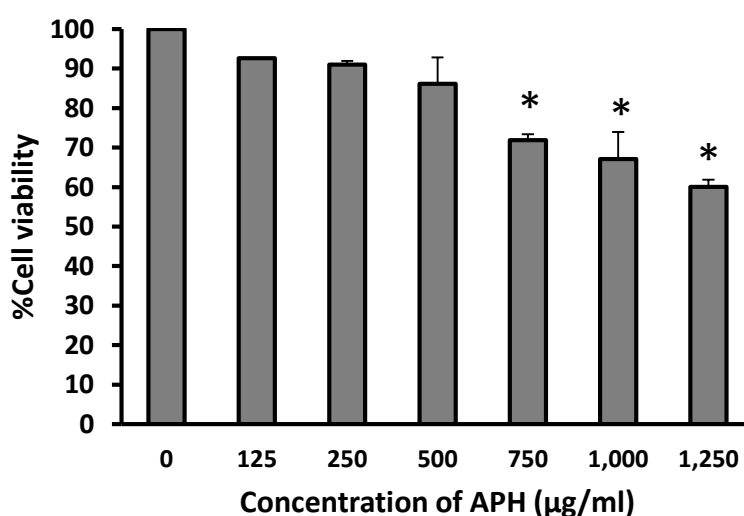


ภาพ 16 การวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อได้รับ H_2O_2 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง
ด้วยวิธี MTT assay (Unpublished data form Sirikan Pongnan)

ความเป็นพิษต่อเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ของโปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่าย *A. platensis*

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ของโปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่าย *A. platensis* ทำโดยนำเซลล์ L6 ที่ผ่านการ differentiation และมี % confluence 70 - 80% มาเติมโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้น 0 – 1,250 µg/ml บ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบด้วยอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay และนำข้อมูลที่ได้ไปหาค่า IC_{50} ผลการทดลองแสดงดังภาพ 17 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังจากได้รับกับโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ของโปรตีนไฮโดรไลสนั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณที่ได้รับ โดยพบว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นสูงกว่า 750 µg/ml ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($*p<0.05$)

กราฟความเป็นพิษของ APH ที่มีต่อเซลล์



ภาพ 17 การวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อได้รับโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay (Mean±SD)

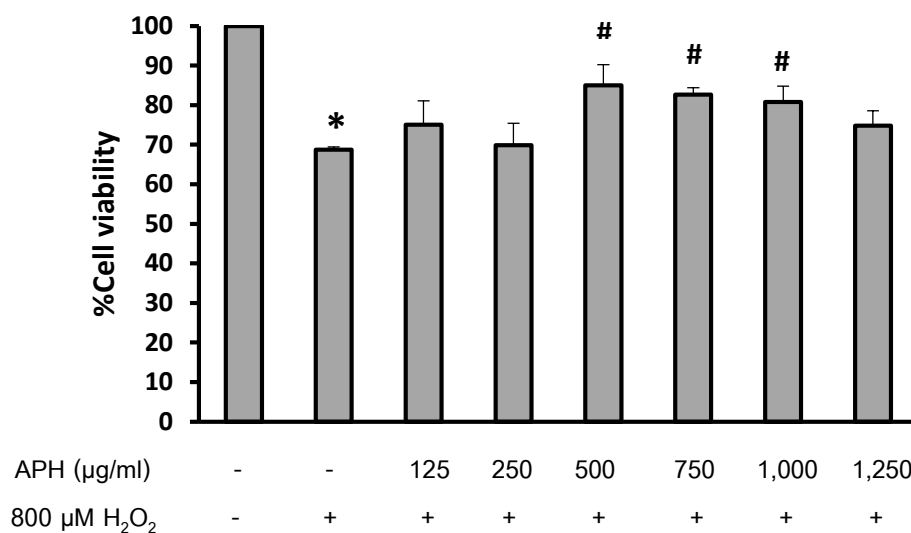
หมายเหตุ: $*p<0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

การทดสอบคุณสมบัติในป้องกันเซลล์จาก H_2O_2 ของโปรตีนไฮโดรไลเซสในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle

การทดลองนี้ทำการศึกษาความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการป้องกันเซลล์จาก H_2O_2 โดยนำเซลล์ L6 ที่ผ่านการ differentiation และมี % confluence ประมาณ 70 - 80% มาเติมโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม $800 \mu M H_2O_2$ บ่มไว้ 3 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์และลักษณะและรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลองในภาพ 18 แสดงให้เห็นถึงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันจากการเหนี่ยวนำของ H_2O_2 โดยพบว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซสก่อนที่จะได้รับ H_2O_2 เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 และเมื่อตรวจสอบดูลักษณะและรูปร่างของเซลล์ตามลักษณะที่ลูกศรชี้พบว่า เซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหาร complete medium มีลักษณะเรียวยาวและรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ $800 \mu M H_2O_2$ พบว่าเซลล์จะมีลักษณะและรูปร่างกลม ซึ่งบ่งบอกถึงความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจาก H_2O_2 และเมื่อสังเกตในกลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซสก่อนที่จะได้รับ H_2O_2 นั้น จะสามารถสังเกตเห็นเซลล์ที่มีลักษณะเรียวยาวและมีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ซึ่งคล้ายคลึงกับกลุ่มควบคุม และยังพบว่าปริมาณของเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เพิ่มสูงขึ้น ดังภาพ 19 การทดลองนี้จึงแสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสมีความสามารถในการป้องกันการเกิดความเสียหายต่อเซลล์จากการถูกเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันได้

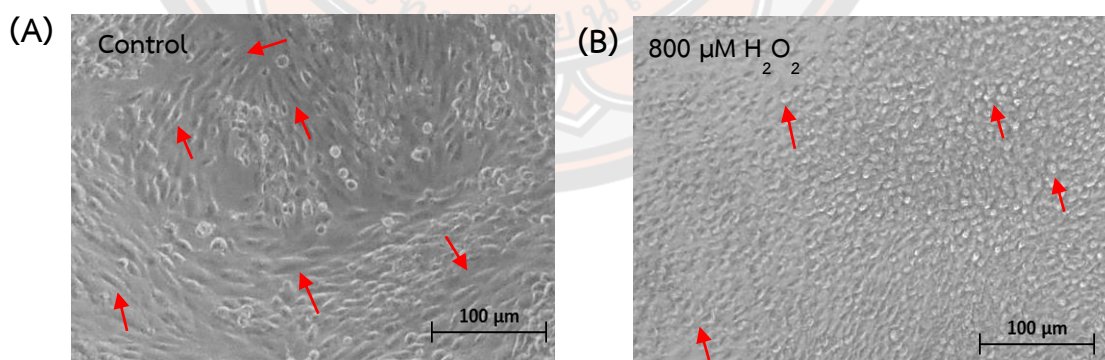
กราฟแสดงคุณสมบัติของ APH ในการป้องกันเซลล์จาก H_2O_2



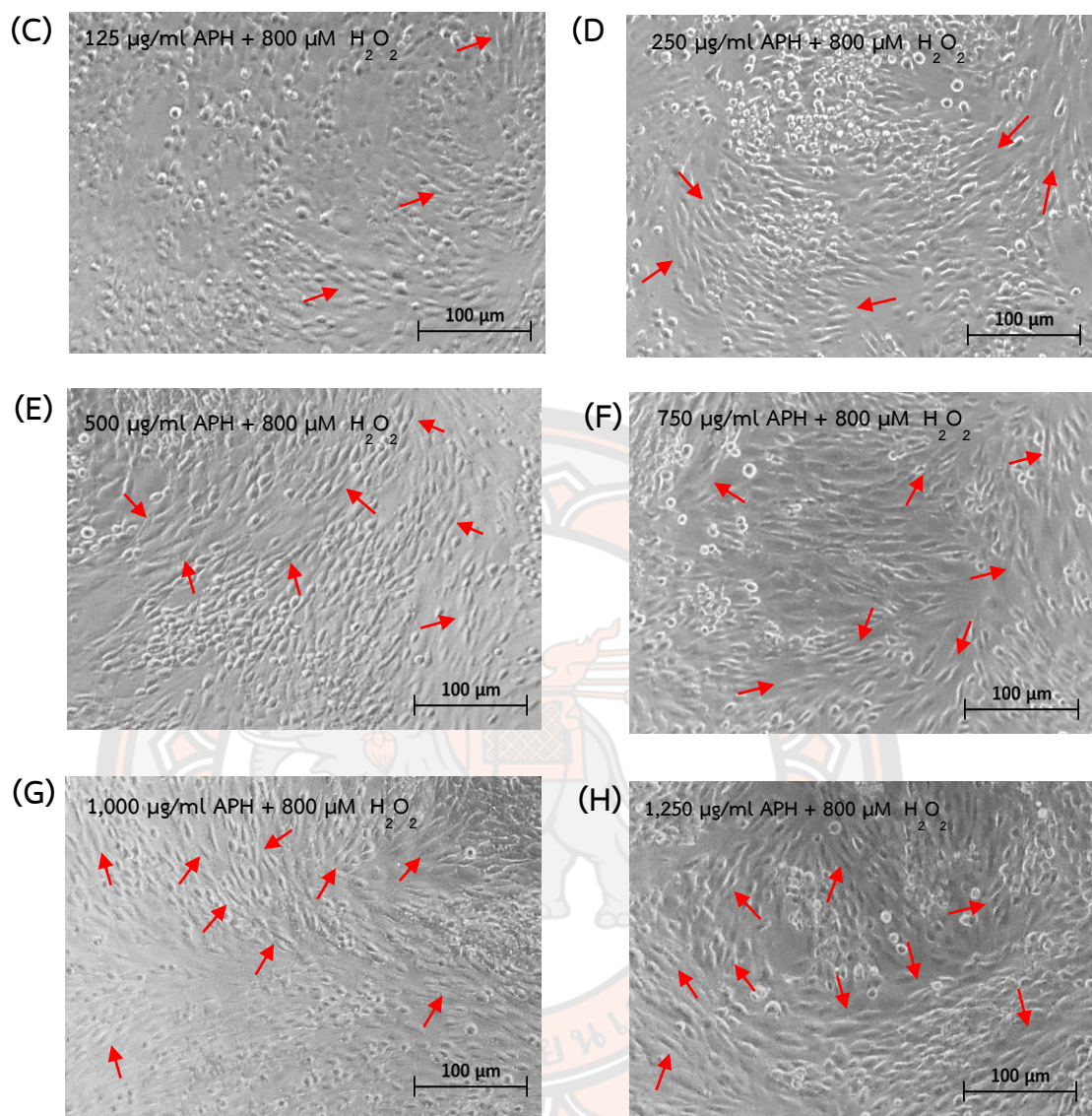
ภาพ 18 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 800 µM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Mean±SD)

หมายเหตุ: * $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2



ภาพ 19 คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสจาก *A. platensis* ในการป้องกันการเกิดความเสียหายต่อเซลล์จากการถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน รูป A คือลักษณะและรูปร่างของเซลล์กลุ่มควบคุม รูป B คือเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ 800 µM H_2O_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และรูป C-H คือเซลล์ที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนได้รับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 800 µM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง



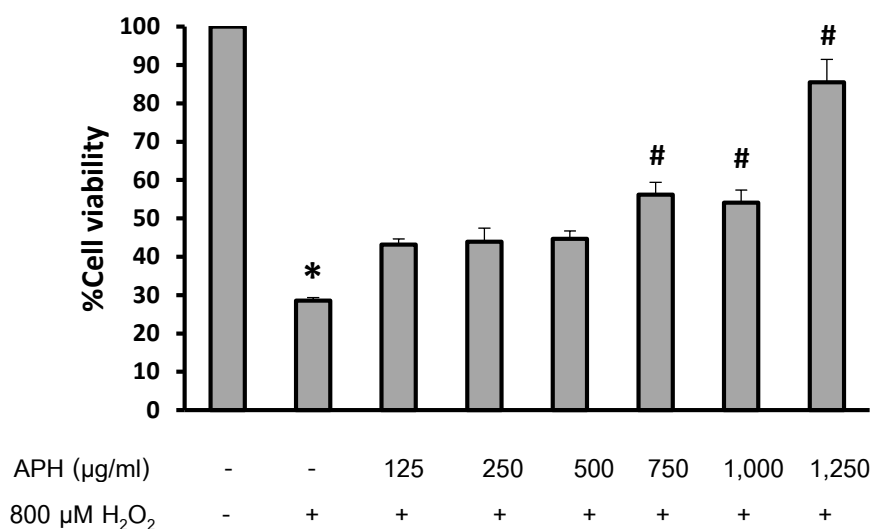
ภาพ 19 (ต่อ)

การทดสอบคุณสมบัติในการลดความเป็นพิษ H_2O_2 ของโปรตีนไฮโดรไลเซตในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle

การทดลองนี้ทำการศึกษาความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซตในการกำจัดและลดภาวะเครียดออกซิเดชันของ H_2O_2 โดยนำเซลล์ L6 ที่ผ่านการ differentiation และมี % confluence ประมาณ 70 - 80% มาทำการเติม 800 μM H_2O_2 บ่มไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้นต่างๆและบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์และดูลักษณะและรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

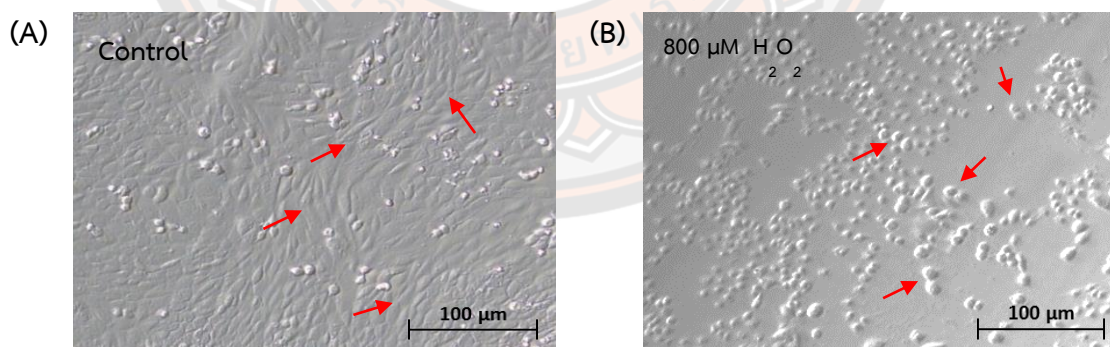
จากผลการทดลองในภาพ 20 แสดงให้เห็นถึงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซตในการลดความเสียหายของ H_2O_2 เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชัน ผลการทดลองพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซตหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 นั้น เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นสูงกว่า 750 $\mu g/ml$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 ($p < 0.05$) และเมื่อตรวจสอบดูลักษณะและรูปร่างของเซลล์ตามลักษณะที่ลูกศรชี้พบว่า เซลล์กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในอาหาร complete medium มีลักษณะเรียวยาวและรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของเซลล์ที่ได้รับ 800 μM H_2O_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะเห็นถึงลักษณะและรูปร่างกลม ซึ่งบ่งบอกถึงความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจาก H_2O_2 จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ชัดว่าเซลล์กลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซตหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 นั้น จะมีลักษณะเรียวยาวและมีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ซึ่งคล้ายคลึงกับกลุ่มควบคุม และยังพบว่าปริมาณของเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เพิ่มสูงขึ้น ดังภาพ 21 การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตมีความสามารถในการลดความเสียหายและฟื้นฟูเซลล์ที่ได้รับความเสียหายจากการถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 ได้

กราฟแสดงคุณสมบัติของ APH ในการลดความเป็นพิษ H_2O_2 ภายในเซลล์

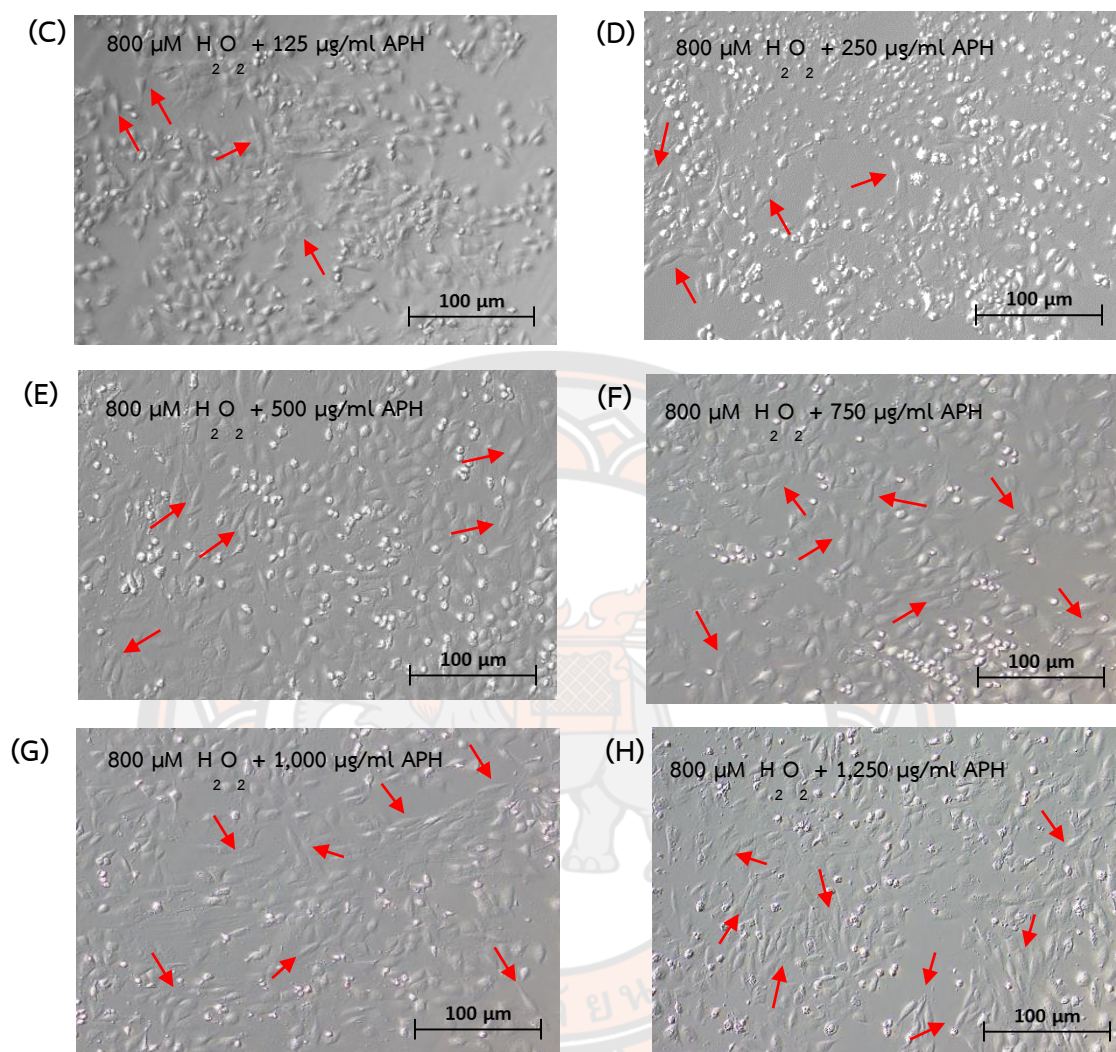


ภาพ 20 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ความเข้มข้น 800 µM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามด้วยโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Mean±SD)

หมายเหตุ: * $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2



ภาพ 21 คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสจาก *A. platensis* ในการลดความเสียหายและฟื้นฟูเซลล์จากการถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 รูป A คือลักษณะและรูปร่างของเซลล์กลุ่ม control รูป B คือเซลล์ที่ได้รับ 800 µM H_2O_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และรูป C-H คือเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ความเข้มข้น 800 µM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นได้รับโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

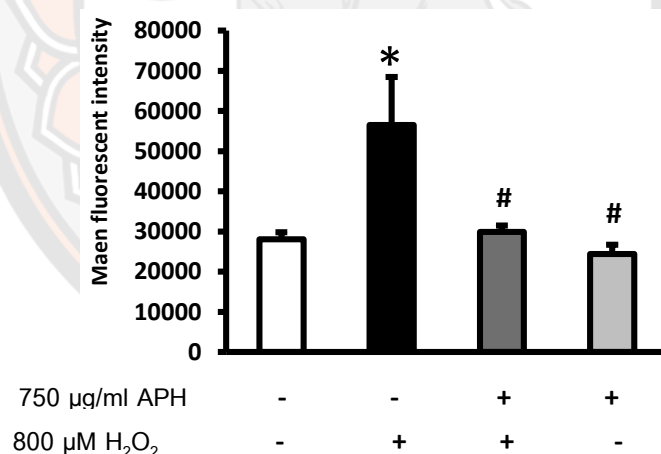


ภาพ 21 (ต่อ)

คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสจาก *A. platensis* ในการลดระดับการสะสมอนุมูลอิสระภายในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ด้วยวิธี DCFH-DA assay

การทดสอบแบบ CO-treatment

ทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสในการลดระดับการสะสม ROS ภายในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle โดยนำเซลล์ที่ผ่านการ differentiation มาทำการทดสอบ โดยการทดสอบจะแบ่งเซลล์เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มแรกคือกลุ่มควบคุมซึ่งเลี้ยงในสภาวะปกติที่มีอาหาร complete medium กลุ่มที่ 2 คือสภาวะที่ได้รับเฉพาะ 800 μM H_2O_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มที่ 3 คือเซลล์ที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้น 750 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับ 800 μM H_2O_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มที่ 4 คือเซลล์ที่ได้รับเฉพาะโปรตีนไฮโดรไลส 750 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงตรวจสอบปริมาณ ROS ในเซลล์ด้วยวิธี DCFH-DA assay ผลการทดลองพบว่าในเซลล์ที่ได้รับทั้ง APH และ H_2O_2 มีค่า fluorescent intensity เท่ากับ 29882.89 ± 1608.61 ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ตรวจวัดได้ในเซลล์กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (56534.33 ± 11972.94) ($^{\#}p < 0.05$) ดังแสดงในภาพ 22 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใส่โปรตีนไฮโดรไลสไปพร้อมกับ H_2O_2 สามารถลดการสะสม ROS ในเซลล์ L6 ได้



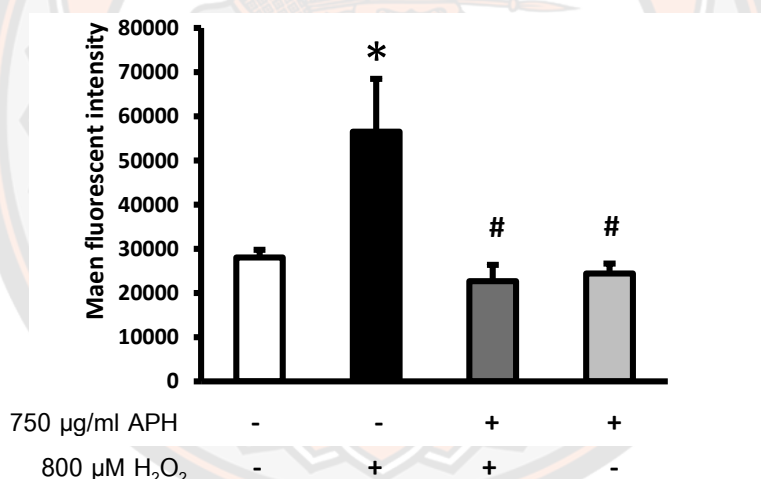
ภาพ 22 แสดงระดับการสะสม ROS ภายในเซลล์ L6 ได้รับ 800 μM H_2O_2 , 750 $\mu\text{g/ml}$ APH หรือทั้ง 800 μM H_2O_2 และ 750 $\mu\text{g/ml}$ APH เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทำการเติม 100 μM DCFH-DA เป็นเวลา 30 นาที ที่ 37 $^{\circ}\text{C}$ ในที่มีด ความเข้มข้นของฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์ของเซลล์ L6

ถูกวัดโดย Microplate reader (Mean $\pm$ SD)

หมายเหตุ: * $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2

การทดสอบแบบ Protection

ทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการลดระดับการสะสม ROS ภายในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle โดยนำเซลล์ที่ผ่านการ differentiation มาทำการทดสอบ โดยการทดสอบจะแบ่งเซลล์เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มแรกคือกลุ่มควบคุมซึ่งเลี้ยงในสภาวะปกติที่มีอาหาร complete medium กลุ่มที่ 2 คือสภาวะที่ได้รับเฉพาะ 800 μM H_2O_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มที่ 3 คือเซลล์ที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วย 800 μM H_2O_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มที่ 4 คือเซลล์ที่ได้รับเฉพาะโปรตีนไฮโดรไลเซส 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงตรวจสอบปริมาณ ROS ในเซลล์ด้วยวิธี DCFH-DA assay ผลการทดลองพบว่าในเซลล์ที่ได้รับทั้ง APH และ H_2O_2 มีค่า fluorescent intensity เท่ากับ 22721.61 ± 3647.52 ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ตรวจวัดได้ในเซลล์กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (56534.33 ± 11972.94) ($p < 0.05$) ดังแสดงในภาพ 23 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใส่โปรตีนไฮโดรไลเซสลงไปก่อนแล้วตามด้วย H_2O_2 สามารถลดการสะสม ROS ในเซลล์ L6 ได้

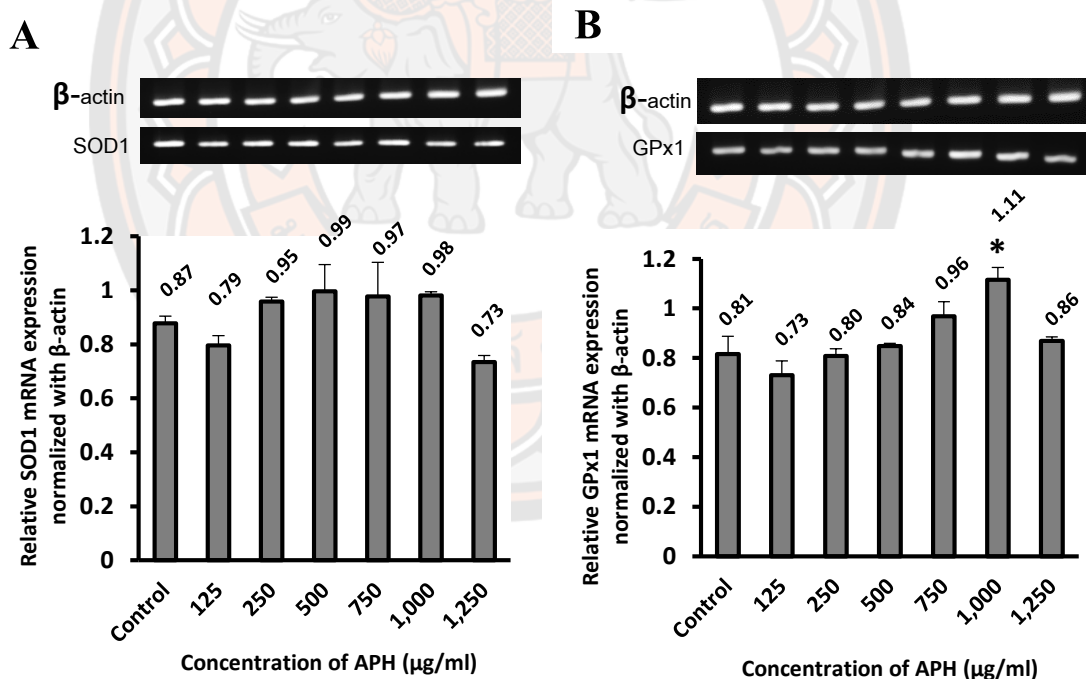


ภาพ 23 แสดงระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์ L6 เมื่อได้รับ 800 μM H_2O_2 และ 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ APH เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือทั้ง 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ APH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วย 800 μM H_2O_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทำการเติม 100 μM DCFH-DA เป็นเวลา 30 นาที ที่ 37°C ในที่มีความเข้มข้นของฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์ของเซลล์ L6 ถูกวัดโดย Microplate reader (Mean $\pm$ SD)

หมายเหตุ: * $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2

คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก *A.platensis* ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบ ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle

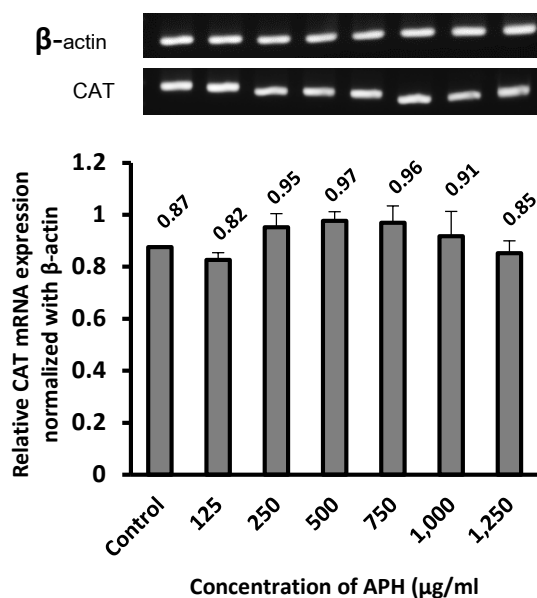
ทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระได้แก่ SOD1, GPx1 และ CAT ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle โดยการนำเซลล์ที่ผ่านการ differentiation มาเติมโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มไว้ 24 ชั่วโมงจึงเก็บเซลล์มาสกัด total RNA และนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนด้วย RT-PCR และวัดการแสดงออกด้วยวิธีแบบ semi-quantitative ผลการทดลองพบว่า การแสดงออกของยีน SOD1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 24A) ในการแสดงออกของยีน GPx1 นั้นพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ค่าความเข้มข้นที่ 0-1000 $\mu\text{g/ml}$ การแสดงออกของยีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($*p<0.05$) และจึงค่อยๆ ลดลงที่ความเข้มข้น 1,250 $\mu\text{g/ml}$ (ภาพ 24B) และการแสดงออกของยีน CAT พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับควบคุม (ภาพ 24C)



ภาพ 24 การศึกษาการแสดงออกของยีน SOD1 (A) GPx1 (B) และ CAT (C) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่าย *A. platensis* ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR (Mean $\pm$ SD)

หมายเหตุ: $*p<0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

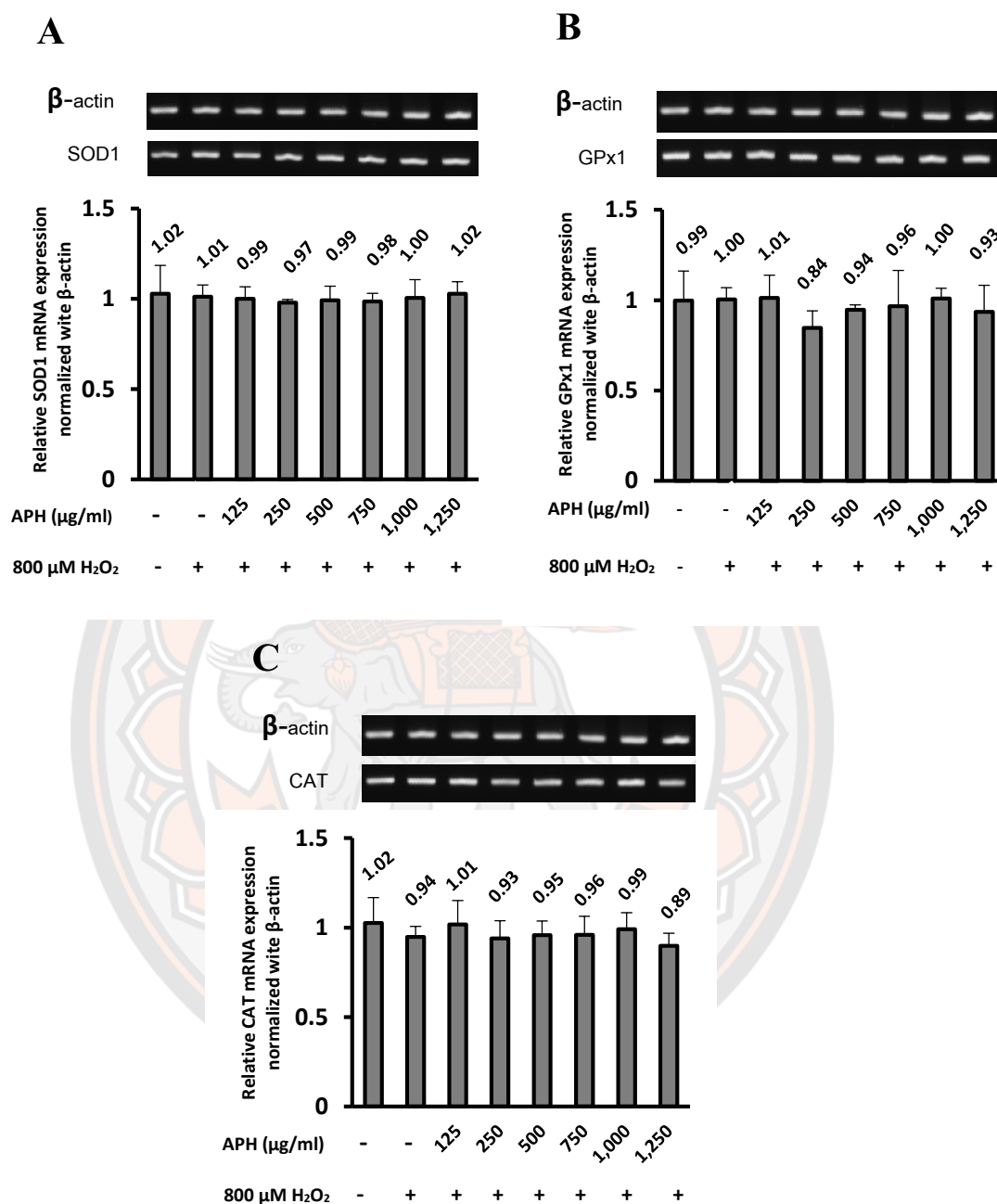
C



ภาพ 24 (ต่อ)

คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน

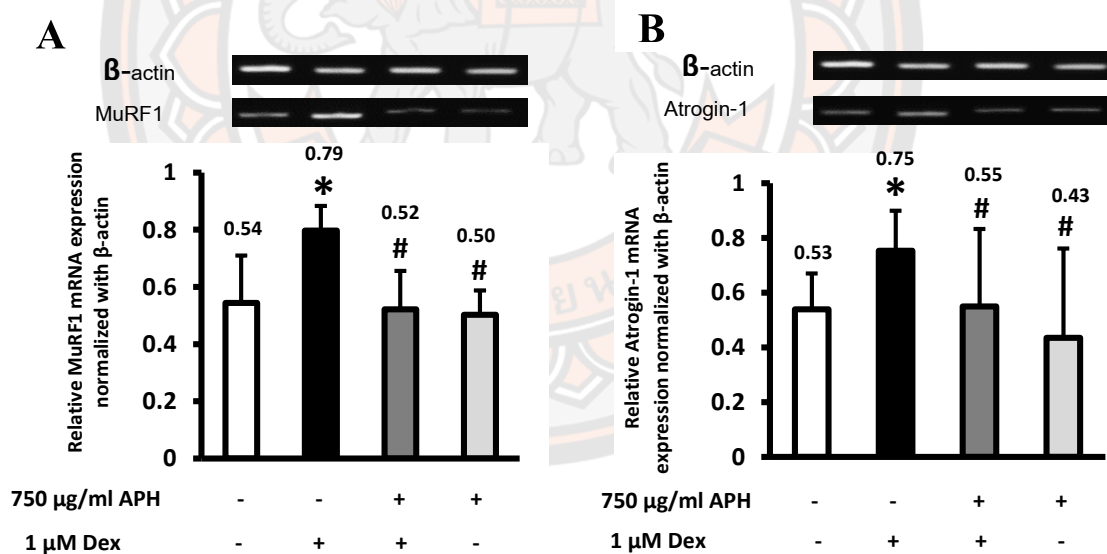
ศึกษาความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน SOD1, GPx1 และ CAT เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันเซลล์ L6 Rat skeletal muscle โดยการนำเซลล์ L6 ที่ผ่านการ differentiation มาทำการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มไว้ 24 ชั่วโมง แล้วจึงเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันด้วยการเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 150 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงเก็บเซลล์มาสกัด total RNA และนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนด้วย RT-PCR และวัดการแสดงออกด้วยวิธีแบบ semi-quantitative ผลการทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน SOD1, GPx1 และ CAT ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับ control ดังภาพ 25 แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน SOD1 GPx1 และ CAT เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชัน



ภาพ 25 การศึกษาการแสดงออกของยีน SOD1 (A) GPx1 (B) และ CAT (C) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากสาหร่าย *A. platensis* ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันโดยการเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 150 μ M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR (Mean $\pm$ SD)

การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการลดระดับการแสดงออกของยีน Muscle atrophy F-box (*Atrogin-1*) และ Muscle ring finger 1 (*MuRF1*) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle

ศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการลดระดับการแสดงออกของยีน *atrogin-1* และ *MuRF1* โดยนำเซลล์ L6 ที่ผ่านการ differentiation มาทำการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซสความเข้มข้น 750 µg/ml บ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Dexamethasone ที่ความเข้มข้น 1 µM บ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้มาทำการสกัด total RNA แล้วนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ผลการทดลองพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *atrogin-1* และ *MuRF1* ในเซลล์ L6 ที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซสก่อนได้รับ dexamethasone นั้นมีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ dexamethasone ($p < 0.05$) ดังภาพ 26 ดังนั้นจากการศึกษานี้ จึงบ่งชี้ได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสมีคุณสมบัติในการลดระดับการแสดงออกของยีน *atrogin-1* และ *MuRF1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของกล้ามเนื้อได้



ภาพ 26 แสดงการแสดงออกของยีน *MuRF1* (A) และ *Atrogin-1* (B) ของเซลล์ L6 เมื่อได้รับ 1 µM Dex, 750 µg/ml APH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รวมทั้งได้รับ 750 µg/ml APH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วย 1 µM Dex เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR (Mean±SD)

หมายเหตุ: * $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ dexamethasone

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผล

จากสถิติพบว่า โครงสร้างประชากรโลกในปัจจุบันมีประชากรผู้สูงอายุเพิ่มมากขึ้น เมื่ออายุเพิ่มขึ้นจะเกิดความเสื่อมของร่างกายตามมาและทำให้เกิดความเจ็บป่วยต่างๆ ภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลง (sarcopenia) เป็นกลุ่มอาการที่พบมากในผู้สูงอายุ (geriatric syndrome) (Promklang D., 2018) สาเหตุของการเกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงในผู้สูงอายุนั้นมีสาเหตุหลายประการ เช่น การสลายโปรตีนกล้ามเนื้อที่เพิ่มขึ้น (Ali & Garcia, 2014) ความบกพร่องในการทำงานของระบบประสาทสั่งการ (motor neuron) (Brown, 1972) การลดลงของ anabolic hormones (Gundersen, 1998) รวมถึงการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรียในเซลล์กล้ามเนื้อ (Johnson et al., 2013) นอกจากนี้หนึ่งในปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงคือการสะสมของ ROS ภายในร่างกาย โดยพบว่าในเนื้อเยื่อของคนที่อยู่ในวัยสูงอายุจะมีการสร้างและสะสมอนุมูลอิสระมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่ง ROS ในปริมาณที่สูงจะส่งผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ (Fulle et al., 2004) จากข้อมูลที่กำลังกล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อที่เพิ่มขึ้นและการเกิดอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงในผู้สูงอายุ ดังนั้นการชะลอการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อและการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระจึงเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันและลดการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อในผู้สูงอายุ โดยในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปกป้องเซลล์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตจากสาหร่าย *A. platensis* โดยใช้เซลล์กล้ามเนื้อหนู (L6 Rat skeletal muscle cell) เป็นโมเดลในการศึกษา ซึ่ง *A. platensis* เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้รับการรับรองจาก Food and Drug Administration (FDA) ว่าเป็นความปลอดภัยต่อผู้บริโภค อุดมไปด้วยโปรตีนสูงถึง 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และที่สำคัญมีรายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ที่ได้จากกระบวนการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเซตของ *A. platensis* สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดีกว่าโปรตีนจากสัตว์ เช่น เวย์โปรตีน และยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Zhang B & Zhang X, 2013) และที่สำคัญมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) สูง โดยมี % DPPH scavenging activity สูงถึง 81.44 ± 0.43 ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีฤทธิ์เทียบเท่ากับ glutathione ($82.63 \pm 0.56\%$) (Yu et al., 2016)

การ Differentiation ของ L6 Rat skeletal muscle cell

จากการศึกษาผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ L6 ที่อยู่ในระยะ myoblast ใน complete medium ที่มี 10% FBS จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการ differentiation จากรยะ myoblast สู่ระยะ myotube โดยการลดความเข้มข้นของ FBS เป็น 2% ซึ่งการ differentiation ของเซลล์กล้ามเนื้อ จากรยะ myoblast สู่ระยะ myotube นั้น การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Jame และคณะได้อธิบายไว้ว่า มักจะถูกควบคุมโดยองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง หรือถูกควบคุมด้วย mitogens ซึ่งเป็นโมเลกุลของเปปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็กที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการแบ่งตัวและการพัฒนาของเซลล์กล้ามเนื้อ โดยพบว่า insulin-like growth factors (IGFs) ซึ่งเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนในกลุ่มของ mitogens ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการ differentiation ของ myoblast cell โดยผ่านการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ myogenin gene ซึ่งเป็น transcription factors ที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนา ซ่อมแซม และสร้างกล้ามเนื้อโครงร่าง โดยพบว่า IGFs นั้นมีการแสดงออกได้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี growth factors ซึ่งก็พบว่าเซลล์กล้ามเนื้อในระยะ myoblast เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของซีรัมที่ต่ำ จะส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของ IGF-II ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน ส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้นการ differentiation ของเซลล์กล้ามเนื้อ (Florini et al., 1991)

ความเป็นพิษต่อเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ของโปรตีนไฮโดรไลสจากจาสาหรัย *A. platensis*

ในการศึกษานี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ของโปรตีนไฮโดรไลสจากจาสาหรัย *A. platensis* ที่ความเข้มข้น 0-1,250 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นทำการตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย MTT assay ผลการทดลองพบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ของโปรตีนไฮโดรไลสนั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณที่ได้รับ โดยพบว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นสูงกว่า 750 $\mu\text{g/ml}$ ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) แสดงดังภาพ 17 โดยจากการศึกษาคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ hydrogen peroxide (H_2O_2) ในเซลล์ L6 ของโปรตีนไฮโดรไลสพบว่ามีโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้น 750 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไปนั้นมีความสามารถในการป้องกันและฟื้นฟูเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ โดยสังเกตได้จากลักษณะรูปร่างของเซลล์และอัตราการรอดชีวิตที่เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้โปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้น 750 $\mu\text{g/ml}$ ในการศึกษาในครั้งนี้ แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้น 750 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สอดคล้องกับผลของการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ดังนั้นต้องมีข้อควรระวังในการนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่าย *A. platensis* ด้วยวิธี ABTS

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก *A. platensis* โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ alcalase ที่ 2% (w/w) แล้วนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไปทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่า ค่า % ABTS free radical scavenging ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่าย *A. platensis* ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ alcalase มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ และพบว่าที่ความเข้มข้น 100, 150, 200, 250 และ 300 $\mu\text{g/ml}$ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า % ABTS free radical scavenging เท่ากับ 90.10 ± 0.53 , 90.10 ± 0.86 , 91.04 ± 0.18 , 91.04 ± 0.82 และ 91.31 ± 0.23 ตามลำดับ ดังภาพ 15 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Yu และคณะ เมื่อปี ค.ศ. 2017 ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตจากสาหร่าย *A. platensis* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมี % DPPH scavenging activity สูงถึง 81.44 ± 0.43 ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ (Yu et al., 2016) เมื่อพิจารณาร่วมกับการศึกษานี้จึงชี้ให้เห็นว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตจากสาหร่าย *A. platensis* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งใน ABTS และ DPPH

แต่อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าโปรตีนกลุ่มที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์นั้นมีการแสดงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน และพบว่าโปรตีนที่ความเข้มข้น 300 $\mu\text{g/ml}$ นั้นมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับกลุ่มที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ดังภาพ 15 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Pyne และคณะ ได้ทำการศึกษางค์ประกอบของสาหร่าย *A. platensis* พบว่า *A. platensis* มีองค์ประกอบของ phycocyanin ในปริมาณสูง (Pyne PK, 2017) และมีการศึกษามากมายพบว่า phycocyanin มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง [(ZHAN-PING ZHOU 2005); (Hua-Lian Wu, 2016); (Iamtham, 2019)] ดังนั้นจึงเป็นผลที่ทำให้โปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นั้นมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน

คุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ hydrogen peroxide (H_2O_2) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle cell ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่าย *A. platensis*

หนึ่งในปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงคือการสะสมของ ROS ภายในร่างกาย โดยพบว่าในเนื้อเยื่อของผู้สูงอายุจะมีการสร้างและสะสมอนุมูลอิสระมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งส่งผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ (Fulle et al., 2004) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการการศึกษาคูณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตใน L6 Rat skeletal muscle ในส่วนแรกคือการทดสอบความสามารถในการป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียด

ออกซิเดชัน ผลการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสสามารถปกป้องเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก H_2O_2 ได้ โดยสามารถสังเกตได้จากลักษณะและรูปร่างของเซลล์ในสภาวะที่มีโปรตีนไฮโดรไลเซสซึ่งคล้ายคลึงกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงในสภาวะปกติ ดังภาพ 18 และเมื่อนำมาทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่า เซลล์ที่ได้โปรตีนไฮโดรไลเซสอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 ดังภาพ 19

ในการศึกษาส่วนที่สองคือการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดพิษและฟื้นฟูเซลล์เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชัน ผลการทดลองพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซสสามารถกำจัดพิษและฟื้นฟูเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก H_2O_2 ได้ โดยสามารถสังเกตได้จากลักษณะและรูปร่างของเซลล์ในสภาวะที่มีโปรตีนไฮโดรไลเซสซึ่งคล้ายคลึงกับกลุ่มควบคุม ดังภาพ 20 และยังพบอีกว่าเมื่อนำมาทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่า เซลล์ที่ได้โปรตีนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นสูงกว่า $750 \mu\text{g/ml}$ มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 ($p < 0.05$) ดังภาพ 21 จากผลการศึกษาทั้งสองการทดลอง สามารถสรุปได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ผลิตจากสาหร่าย *A. platensis* มีคุณสมบัติในการป้องกันและฟื้นฟูเซลล์ที่เกิดความเสียหายจากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้

คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสจาก *A. platensis* ในการลดระดับการสะสมอนุมูลอิสระภายในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ด้วยวิธี DCFH-DA assay

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสมีคุณสมบัติในการป้องกันและฟื้นฟูเซลล์จากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการลดระดับการสะสม ROS เพื่อดูความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการกำจัดพิษ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยผู้วิจัยได้ทำการศึกษาลดการสะสมของ ROS ทั้งในแบบ co-treatment และ protection ด้วยวิธี DCFH-DA assay ในส่วนแรกจะเป็นการทดสอบแบบ co-treatment โดยผู้วิจัยได้ทำการแบ่งกลุ่มทดสอบออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 ($1 \mu\text{M}$) กลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซส ($750 \mu\text{g/ml}$) ร่วมกับ H_2O_2 ($1 \mu\text{M}$) และกลุ่มที่ได้รับเฉพาะโปรตีนไฮโดรไลเซส ($750 \mu\text{g/ml}$) ผลการศึกษพบว่า การสะสม ROS ในเซลล์ของกลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซสร่วมกับ H_2O_2 ($1 \mu\text{M}$) นั้นมีค่า fluorescent intensity ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 ($1 \mu\text{M}$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มที่ได้รับการทดสอบแบบ co-treatment มีค่า fluorescent intensity เท่ากับ 29882.89 ± 1608.61 เมื่อเทียบกับการได้รับเฉพาะ H_2O_2 ($1 \mu\text{M}$) ซึ่งมีค่า fluorescent intensity เท่ากับ 56534.33 ± 11972.94 ดังภาพ 22

ในการทดสอบแบบ protection ผู้วิจัยได้แบ่งกลุ่มการทดสอบออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 ($1 \mu\text{M}$) กลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซส ($750 \mu\text{g/ml}$) ตามด้วย

H₂O₂ (1 μ M) และกลุ่มที่ได้รับเฉพาะโปรตีนไฮโดรไลเซส (750 μ g/ml) ผลการศึกษาพบว่า การสะสม ROS ในเซลล์ของกลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซส (750 μ g/ml) ตามด้วย H₂O₂ (1 μ M) นั้นมีค่า fluorescent intensity ที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H₂O₂ (1 μ M) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มที่ได้รับการทดสอบแบบ protection มีค่า fluorescent intensity เท่ากับ 22721.61 ± 3647.52 เมื่อเทียบกับการได้รับเฉพาะ H₂O₂ (1 μ M) ซึ่งมีค่า fluorescent intensity เท่ากับ 56534.33 ± 11972.94 ดังภาพ 23

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า โปรตีนไฮโดรไลเซสสามารถลดการสะสมของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ทั้งในแบบ co-treatment และ protection ได้ จากการศึกษาของ Liu และคณะ พบว่า กรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นอะโรมาติก ได้แก่ ไทโรซีน ทรีปโตเฟน และฟีนิลอะลานีน สามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระเพื่อกำจัด ROS ได้ (Liu et al., 2015) และในการศึกษาของ Pyne และคณะ ได้ทำการศึกษารองประกอบของสาหร่าย *A. platensis* พบว่า *A. platensis* มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนอะโรมาติก ได้แก่ ทรีปโตเฟน และฟีนิลอะลานีนสูง (Pyne PK, 2017) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการลดการสะสมของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ L6 นั้นอาจเป็นผลมาจากกรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติก จากการศึกษาสรุปได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสมีประสิทธิภาพในลดการสะสมและกำจัด ROS ภายในเซลล์ได้ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการป้องกันและฟื้นฟูเซลล์เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชันดังที่ได้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้

คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสจาก *A.platensis* ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle

เป็นที่ทราบกันว่า ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์นั้น จะถูกกำจัดโดยผ่านการเอนไซม์ภายในร่างกาย ที่เรียกว่า antioxidant enzymes ประกอบไปด้วยเอนไซม์หลักที่สำคัญได้แก่ superoxide dismutases (SOD), catalases และ glutathione peroxidases (GPx) ซึ่งแต่ละเอนไซม์มีโมเลกุลเป้าหมายที่ต่างกันไป โดย SOD นั้นจะแบ่งออกเป็นสาม isoforms ได้แก่ SOD1 (CuZn-SOD) พบการแสดงออกที่ไซโทพลาสซึม นิวเคลียส (Weydert & Cullen, 2010) และไมโทคอนเดรีย [(Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001); (Sturtz, Diekert, Jensen, Lill, & Culotta, 2001)] SOD2 (Mn-SOD) พบการแสดงออกที่ไมโทคอนเดรีย และ SOD3 (Extracellular-SOD) จะมีการแสดงออกภายนอกเซลล์ในเนื้อเยื่อต่างๆ โดย SOD เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ superoxide (O₂⁻) ให้เปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide H₂O₂ และออกซิเจน (O₂) มีผลการศึกษามากมายพบว่า SOD1 และ SOD2 มีบทบาทในการป้องกันการเกิด ROS [(Fridovich, 1995); (Bannister, Bannister, & Rotilio, 1987); (Fridovich, 1997)] ส่วน GPx นั้นสามารถแบ่ง

ตาม isoforms ตามตำแหน่งต่างๆที่พบได้แก่ GPx1 ถูกพบว่าพบได้ในไซโตซอล นิวเคลียส และไมโทคอนเดรีย GPx2 พบในไซโตซอลและนิวเคลียส GPx3 เป็นโปรตีนที่หลั่งออกมาซึ่งพบได้ในไซโตซอล ในขณะที่ GPx4 มีอยู่ในนิวเคลียส ไซโทซอล ไมโทคอนเดรีย และบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Margis, Dunand, Teixeira, & Margis-Pinheiro, 2008) และอีกสองตัวคือ GPx5 และ GPx6 ซึ่ง GPx5 นั้นหลั่งออกมาในหลอดน้ำอสุจิ และ GPx6 นั้นพบได้ในเยื่อหุ้มตัวรับกลืน (Ghyselinck, Jimenez, Lefrançois, & Dufau, 1990) GPx เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ (H_2O) และในส่วนของ catalases นั้นพบว่าส่วนใหญ่มีการแสดงออกที่อยู่ในออร์แกเนลล์ขนาดเล็กหรือที่เรียกว่า เพอรอกซิโซม (Peroxisome) โดยทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ (H_2O) และได้เป็นโมเลกุลของ O_2 ด้วย (Weydert & Cullen, 2010)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า SOD และ GPx นั้นมีหลาย isoforms ด้วยกัน ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการเลือก SOD1 และ GPx1 มาเป็นตัวแทนในการศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่มแอนติออกซิแดนท์ เนื่องจาก SOD1 และ GPx1 นั้นเป็น isoforms ที่พบการแสดงออกในไมโทคอนเดรีย ซึ่งสาเหตุของการเกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงนั้น สาเหตุหนึ่งก็คือ เกิดจากไมโทคอนเดรียในเซลล์กล้ามเนื้อสูญเสียการทำงาน (Matthew L. et al, 2012) และพบว่าเมื่ออายุเพิ่มขึ้นจะเกิดการผลิต ROS เพิ่มขึ้น จึงมีผลทำให้เกิดการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย ส่งผลเสียต่อการทำงานของกล้ามเนื้อ [(Miquel J, 1993); (Hunt J, 1998)] ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือก isoforms ของ SOD1 และ GPx1 เพื่อตัวแทนในการศึกษาการแสดงออกของยีน SOD และ GPx ในการศึกษานี้

จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่าย *A. platensis* มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ L6 ได้ ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคูสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ SOD1, GPx1 และ CAT ในเซลล์ L6 ที่สภาวะปกติ โดยผู้วิจัยแบบกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่างๆ จากการศึกษพบว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้น 0 - 500 $\mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน SOD1 ได้ โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและค่อยๆลดลงที่ความเข้มข้น 1,250 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังภาพ 24A ส่วนในการแสดงออกของยีน GPx1 พบว่าค่าความเข้มข้นที่ 0-1000 $\mu\text{g/ml}$ มีแนวโน้มการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และค่อยๆลดลงที่ความเข้มข้น 1,250 $\mu\text{g/ml}$ ดังภาพ 24B และในการแสดงออกของยีน CAT พบว่าที่ความเข้มข้น 0-1000 $\mu\text{g/ml}$ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับควบคุม และค่อยๆลดลงที่ความเข้มข้น 1,250 $\mu\text{g/ml}$ เช่นกัน ดังภาพ 24C

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสมีความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน GPx1 แต่ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน SOD1 และ CAT ในเซลล์ได้ โดยการศึกษาของ Nimse ได้อธิบายไว้ว่า GPx1 เป็นเอนไซม์ในระบบต้านอนุมูลอิสระ โดยบทบาทหน้าที่ในการช่วยเร่งปฏิกิริยา reduction ของ H_2O_2 ซึ่งจะทำให้การเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ (H_2O) (Nimse S.B, 2015) และในการศึกษาของ Barbieri และ Sestili พบว่า การทำงานของไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการผลิต ROS ในเซลล์กล้ามเนื้อโครงร่าง การเพิ่มขึ้นของ ROS เกิดขึ้นได้ในกิจกรรมการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ ส่งผลให้ในสภาวะปกติของเซลล์ L6 นั้นมีการผลิต ROS เกิดขึ้น (Barbieri E และ Sestili P, 2012)

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ในสภาวะปกติเซลล์มีการผลิต ROS จากการทำงานของไมโทคอนเดรียและการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ เมื่อเซลล์ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซสจึงส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในระบบต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะ GPx1 เพื่อมาลดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่า CAT นั้นไม่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้อาจจะเนื่องมาจาก CAT และ GPx นั้นทำงานใน path way เดียวกัน เมื่อมีการแสดงออกของ GPx เข้าไปกำจัด ros ดังนั้น CAT จึงไม่มีการแสดงออก

คุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน

การศึกษานี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน SOD1, GPx1 และ CAT เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันในเซลล์ L6 โดยผู้วิจัยได้ทำการแบ่งกลุ่มทดสอบออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 (150 μ M) และกลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามด้วย H_2O_2 (150 μ M) จากการศึกษาพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน SOD1, GPx1 และ CAT ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ H_2O_2 (150 μ M) ($p < 0.05$) ดังภาพ 25A-C จึงแสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสไม่มีความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน SOD1, GPx1 และ CAT ภายในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน

แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสจะไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน แต่จากผลการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการลดระดับการสะสมอนุมูลอิสระภายในเซลล์ L6 ด้วยวิธี DCFH-DA assay ก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่า โปรตีนไฮโดรไลเซสมีความสามารถในการกำจัดและลดระดับการสะสมของ ROS ภายในเซลล์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การที่ยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระไม่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นให้เกิดความเครียดออกซิเดชันนั้น อาจเป็นผลจากการที่โปรตีน

ไฮโดรไลสไปมัยบพาทหน้าที่ในการกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ จึงส่งผลให้เอนไซม์ระบบต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะ GPx1 นั้นไม่เกิดการทำงาน ทำให้ยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระไม่มีการแสดงออกเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชัน

จากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสไปมัยบพาทในการต้านอนุมูลอิสระจะเห็นว่า โปรตีนไฮโดรไลสไปมัยบพาทมีความสามารถในการลดอนุมูลอิสระในรูปแบบของ ABTS ได้ และเมื่อทำการศึกษาคูณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์กล้ามเนื้อก็พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสไปมัยบพาทนั้นมีความสามารถในการป้องกันและฟื้นฟูเซลล์จากสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันได้ ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคูณสมบัติในการลดการสะสมของ ROS ภายในเซลล์ก็แสดงให้เห็นว่า โปรตีนไฮโดรไลสไปมัยบพาทนั้นสามารถลดระดับและกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์กล้ามเนื้อได้ ในการศึกษาคูณสมบัติในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระ ผลการศึกษาก็พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสไปมัยบพาทมีความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน GPx1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่อยู่ในสภาวะปกติได้ แต่ไม่มีความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะ GPx1 ภายในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นผลมาจากการที่โปรตีนไฮโดรไลสไปมัยบพาทนั้นมีความสามารถในการลดระดับและกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลสไปมัยบพาทในการกำจัด ROS มากกว่าการไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชัน

การศึกษาคูณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสไปมัยบพาทในการลดระดับการแสดงออกของยีน Muscle atrophy F-box (*Atrogin-1*) และ Muscle ring finger 1 (*MuRF1*) ในเซลล์ L6 Rat skeletal muscle

จากที่ได้กล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อที่เพิ่มขึ้นก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่พบมากในการเกิดโรค sarcopenia ในผู้สูงอายุ (Ali & Garcia, 2014) โดยกระบวนการ UPS เป็นกระบวนการหลักที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของโปรตีนกล้ามเนื้อที่หมดอายุการใช้งานแล้ว จากการศึกษาพบว่ากระบวนการ UPS (Bodine et al., 2001) มียีนสองยีนคือ atrogin-1 และ MuRF1 เป็นยีนที่เข้ารหัสสำหรับ E3 (ubiquitin protein ligase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำต่อ substrate ในกระบวนการสลายโปรตีนผ่าน UPS โดยจะมีการแสดงออกในกล้ามเนื้อโครงร่าง (skeletal muscles) และทำหน้าที่ในการควบคุมการสลายตัวของกล้ามเนื้อ (Cao et al., 2005) จึงชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของ atrogin-1 และ MuRF1 อาจใช้เป็น maker ที่สามารถบ่งชี้ได้ว่ากล้ามเนื้อโครงร่างเกิดการสลายผ่านกระบวนการ UPS (Latres et al., 2005) และในการศึกษาส่วนใหญ่ L6 rat หรือ C2C12 mouse myotubes cells ถูกใช้เป็นโมเดลในการศึกษา โดยได้รับการกระตุ้นด้วย dexamethasone ซึ่งยาในกลุ่มของ glucocorticoid ส่งผลให้การย่อยสลายโปรตีน

กล้ามเนื้อและเกิดการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 เพิ่มขึ้น[(Stitt et al., 2004); (Evenson et al., 2005); (Latres et al., 2005); (Yang et al., 2005); (Marinovic et al., 2007)] ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสเทสในการลดระดับการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อ โดยผู้วิจัยได้แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ dexamethasone (1 μ M) กลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลสเทส (750 μ g/ml) ตามด้วย dexamethasone (1 μ M) และกลุ่มที่ได้รับเฉพาะโปรตีนไฮโดรไลสเทส (750 μ g/ml)

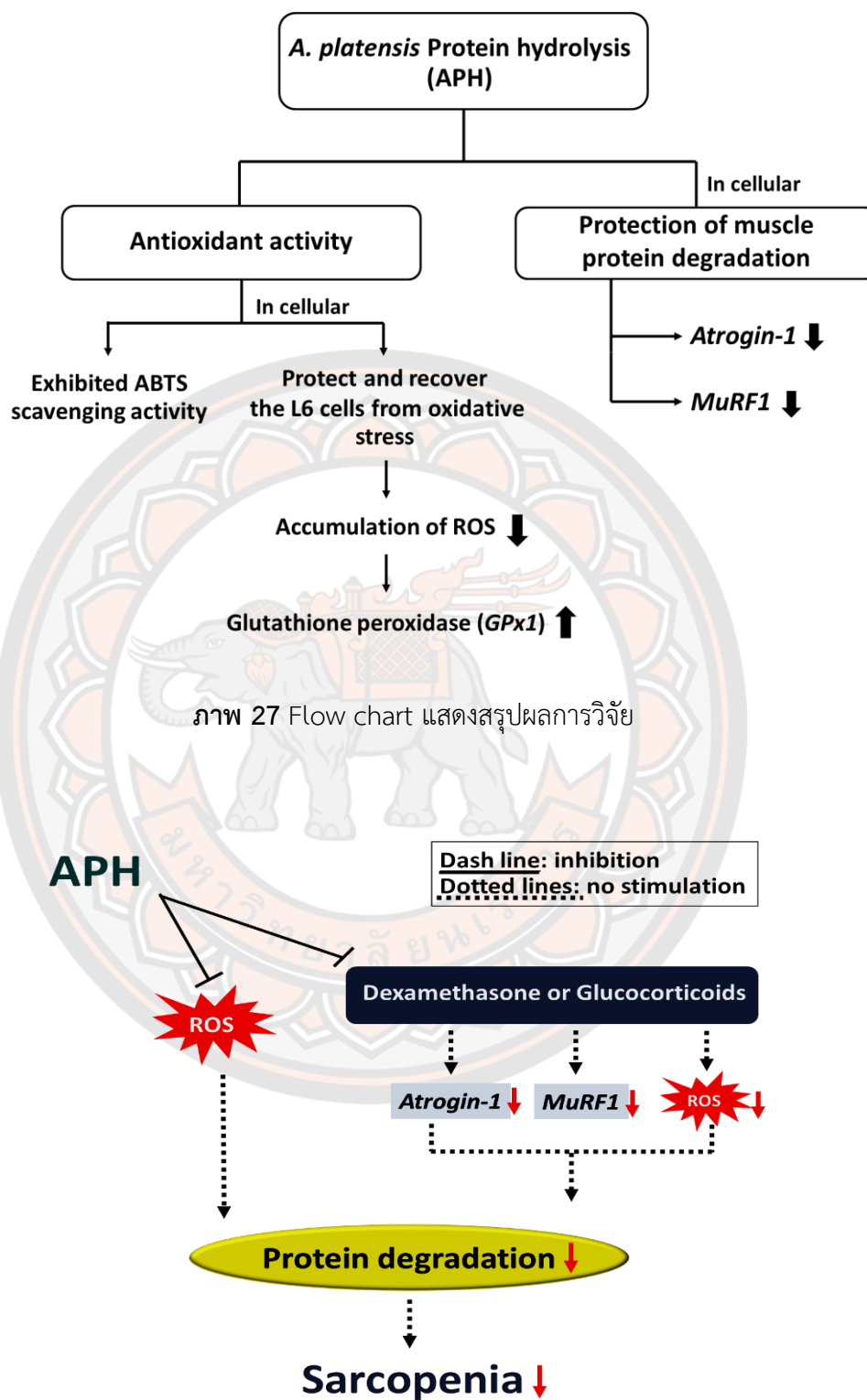
จากการศึกษาพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 ในเซลล์ของกลุ่มที่ได้รับโปรตีนไฮโดรไลสเทส (750 μ g/ml) ตามด้วย dexamethasone (1 μ M) มีการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ Dexamethasone (1 μ M) ดังภาพ 26A-B ดังนั้นจากการศึกษานี้ จึงบ่งชี้ได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลสเทสมีคุณสมบัติในการลดระดับการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสลายตัวของกล้ามเนื้อได้ โดยศึกษาก่อนหน้านั้นแสดงให้เห็นว่า glucocorticoids ส่งเสริมให้เกิดความผิดปกติของไมโทคอนเดรียในกล้ามเนื้อโครงร่าง (Mitsui et al., 2002) ยิ่งไปกว่านั้นพบว่า glucocorticoid ที่มีการสังเคราะห์ขึ้น หรือ dexamethasone สามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิต ROS ภายในกล้ามเนื้อโครงร่าง ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อ [(Oshima, Kuroda, Kunishige, Matsumoto, & Mitsui, 2004); (Orzechowski et al., 2002); (Orzechowski et al., 2003)] ซึ่ง ROS ที่เกิดขึ้นนั้นสามารถกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อผ่านกระบวนการ UPS โดย ROS ส่งผลให้เกิดการเพิ่มการส่งสัญญาณ FOXO3a ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 ในกล้ามเนื้อโครงร่าง จึงทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อ [(Marone, Falduto, Essig, & Hickson, 1994); (Orzechowski et al., 2003)]

จากผลการศึกษาข้างต้นจึงบ่งชี้ได้ว่า การที่โปรตีนไฮโดรไลสเทสมีความสามารถในการลดระดับการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 ในเซลล์เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย dexamethasone อาจจะเป็นเนื่องมาจากการที่โปรตีนไฮโดรไลสเทสมีคุณสมบัติในการกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นผ่านการกระตุ้นด้วย dexamethasone จึงส่งผลทำให้ไม่เกิดการกระตุ้นการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อผ่านกระบวนการ UPS

สรุปผลงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของโปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่าย *A. platensis* ในการต้านอนุมูลอิสระและป้องกันเซลล์กล้ามเนื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย จากนั้นทำการสกัดโปรตีนและทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส นำโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่มีความเข้มข้น 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงถึง $90.10 \pm 0.53\%$ จากนั้นศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ L6 พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสสามารถป้องกันและฟื้นฟูเซลล์จากความเสียหายที่เกิดจาก H_2O_2 ได้ ต่อมาผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคูณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสในการลดการสะสมของ ROS ภายในเซลล์ทั้งในรูปแบบของ co-treatment และ protection ด้วยวิธี DCFH-DA assay พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสสามารถลดการสะสม ROS ในเซลล์ได้ โดยพบว่าการทดสอบทั้งในรูปแบบของ co-treatment และ protection นั้นมีค่า fluorescence intensity ต่ำกว่าการได้รับเฉพาะ H_2O_2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในการศึกษาสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระพบว่า โปรตีนไฮโดรไลสสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระในสภาวะปกติได้โดยเฉพาะยีน GPx1 ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) แต่ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งเป็นผลมาจากการที่โปรตีนไฮโดรไลสนั้นมีคุณสมบัติในการลดระดับและกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลสจึงมีบทบาทในการกำจัด ROS มากกว่าการไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนในระบบต้านอนุมูลอิสระเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียดออกซิเดชัน และในส่วนสุดท้ายผู้วิจัยทำการศึกษาคูณสมบัตการลดการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในกระบวนการ UPS จากการศึกษาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลสสามารถลดระดับการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 ในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จึงส่งผลทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อผ่านกระบวนการ UPS ลดลง

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า โปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่าย *A. platensis* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถป้องกันและฟื้นฟูเซลล์ที่เกิดความเสียหายจากสภาวะเครียดออกซิเดชัน และสามารถลดการสะสม ROS ภายในเซลล์กล้ามเนื้อได้ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการลดการแสดงออกของยีน atrogin-1 และ MuRF1 ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อได้ ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาโปรตีนไฮโดรไลสจากสาหร่าย *A. platensis* เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อป้องกันภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงต่อไป



ภาพ 27 Flow chart แสดงสรุปผลการวิจัย

ภาพ 28 ภาพรวมของงานวิจัย

บรรณานุกรม

- Ali, S., & Garcia, J. M. (2014). Sarcopenia, cachexia and aging: diagnosis, mechanisms and therapeutic options - a mini-review. *Gerontology*, 60(4), 294-305. doi: 10.1159/000356760
- Attaix, D., Mosoni, L., Dardevet, D., Combaret, L., Mirand, P. P., & Grizard, J. (2005). Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(10), 1962-1973. doi: 10.1016/j.biocel.2005.04.009
- Bannister, J. V., Bannister, W. H., & Rotilio, G. (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem*, 22(2), 111-180. doi: 10.3109/10409238709083738
- Bhasin, S., Taylor, W. E., Singh, R., Artaza, J., Sinha-Hikim, I., Jasuja, R., . . . Gonzalez-Cadavid, N. F. (2003). The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 58(12), M1103-1110. doi: 10.1093/gerona/58.12.m1103
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., . . . Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 3(11), 1014-1019. doi: 10.1038/ncb1101-1014
- Bowen, T. S., Schuler, G., & Adams, V. (2015). Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 6(3), 197-207. doi: 10.1002/jcsm.12043
- Brown, W. F. (1972). A method for estimating the number of motor units in thenar muscles and the changes in motor unit count with ageing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 35(6), 845-852. doi: 10.1136/jnnp.35.6.845
- Bucci, L. R., Unlu, L. (2000). Protein and amino acid supplements in exercise and sport. *Boca Raton, FL: CRC Press*, 191-212.
- Buonocore, D., Rucci, S., Vandoni, M., Negro, M., & Marzatico, F. (2011). Oxidative system

- in aged skeletal muscle. *Muscles Ligaments Tendons J*, 1(3), 85-90.
- Cao, P. R., Kim, H. J., & Lecker, S. H. (2005). Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(10), 2088-2097. doi: 10.1016/j.biocel.2004.11.010
- Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J., & Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides*, 38(2), 344-349. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.017
- Clarke, B. A., Drujan, D., Willis, M. S., Murphy, L. O., Corpina, R. A., Burova, E., . . . Glass, D. J. (2007). The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab*, 6(5), 376-385. doi: 10.1016/j.cmet.2007.09.009
- Cohen, S., Brault, J. J., Gygi, S. P., Glass, D. J., Valenzuela, D. M., Gartner, C., . . . Goldberg, A. L. (2009). During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol*, 185(6), 1083-1095. doi: 10.1083/jcb.200901052
- Cornelli, U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*, 27(2), 175-194.
- Coscueta, E. R., Amorim, M. M., Voss, G. B., Nerli, B. B., Picó, G. A., & Pintado, M. E. (2016). Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis. *Food Chem*, 198, 36-44. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.068
- Ebner, N., Sliziuk, V., Scherbakov, N., & Sandek, A. (2015). Muscle wasting in ageing and chronic illness. *ESC Heart Fail*, 2(2), 58-68. doi: 10.1002/ehf2.12033
- Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem*, 19(10), 643-654. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.11.010
- Escudero, E., Mora, L., Fraser, P. D., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2013). Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Food Chem*, 138(2-3), 1282-1288. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.133
- Evenson, A. R., Fareed, M. U., Menconi, M. J., Mitchell, J. C., & Hasselgren, P. O. (2005). GSK-3 β inhibitors reduce protein degradation in muscles from septic rats and in dexamethasone-treated myotubes. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(10), 2226-2238.

doi: 10.1016/j.biocel.2005.06.002

- Florini, J. R., Magri, K. A., Ewton, D. Z., James, P. L., Grindstaff, K., & Rotwein, P. S. (1991). "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem*, 266(24), 15917-15923.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 64, 97-112. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*, 272(30), 18515-18517. doi: 10.1074/jbc.272.30.18515
- Fulle, S., Protasi, F., Di Tano, G., Pietrangelo, T., Beltramin, A., Boncompagni, S., . . . Fanò, G. (2004). The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp Gerontol*, 39(1), 17-24. doi: 10.1016/j.exger.2003.09.012
- García-Tejedor, A., Sánchez-Rivera, L., Castelló-Ruiz, M., Recio, I., Salom, J. B., & Manzanares, P. (2014). Novel antihypertensive lactoferrin-derived peptides produced by *Kluyveromyces marxianus*: gastrointestinal stability profile and in vivo angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition. *J Agric Food Chem*, 62(7), 1609-1616. doi: 10.1021/jf4053868
- Ghyselinck, N. B., Jimenez, C., Lefrançois, A. M., & Dufaure, J. P. (1990). Molecular cloning of a cDNA for androgen-regulated proteins secreted by the mouse epididymis. *J Mol Endocrinol*, 4(1), 5-12. doi: 10.1677/jme.0.0040005
- Girgih, A. T., He, R., Hasan, F. M., Udenigwe, C. C., Gill, T. A., & Aluko, R. E. (2015). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chem*, 173, 652-659. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.079
- Glass, D. J. (2003). Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol*, 5(2), 87-90. doi: 10.1038/ncb0203-87
- Glickman, M. H., & Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 82(2), 373-428. doi: 10.1152/physrev.00027.2001
- Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A., & Goldberg, A. L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A*, 98(25), 14440-14445. doi: 10.1073/pnas.251541198
- Gomes, M. J., Martinez, P. F., Pagan, L. U., Damatto, R. L., Cezar, M. D. M., Lima, A. R. R., . . . Okoshi, M. P. (2017). Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget*, 8(12), 20428-20440. doi: 10.18632/oncotarget.14670
- Greque de Moraes, M., Klasener da Silva, C., Henrard, AA, Vieira Costa, JA. (2015). Carbon dioxide mitigation by microalga in a vertical tubular reactor with recycling of the culture medium. *Microbiology Research*, 9(33), 1935-1940.
- Gundersen, K. (1998). Determination of muscle contractile properties: the importance of the nerve. *Acta Physiol Scand*, 162(3), 333-341. doi: 10.1046/j.1365-201X.1998.0336e.x
- Hasselgren, P. O., Alamdari, N., Aversa, Z., Gonnella, P., Smith, I. J., & Tizio, S. (2010). Corticosteroids and muscle wasting: role of transcription factors, nuclear cofactors, and hyperacetylation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13(4), 423-428. doi: 10.1097/MCO.0b013e32833a5107
- He, H. L., Liu, D., & Ma, C. B. (2013). Review on the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitor peptides from marine proteins. *Appl Biochem Biotechnol*, 169(3), 738-749. doi: 10.1007/s12010-012-0024-y
- Herningtyas, E. H., Okimura, Y., Handayaningsih, A. E., Yamamoto, D., Maki, T., Iida, K., . . . Chihara, K. (2008). Branched-chain amino acids and arginine suppress MaFbx/atrogen-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. *Biochim Biophys Acta*, 1780(10), 1115-1120. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.06.004
- Hua-Lian Wu, G.-H. W., Wen-Zhou Xiang, Tao Li, Hui He. (2016). Stability and Antioxidant Activity of Food-Grade Phycocyanin Isolated from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Properties*, 19(10).
- Husmann, I., Soulet, L., Gautron, J., Martelly, I., & Barritault, D. (1996). Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7(3), 249-258. doi: 10.1016/s1359-6101(96)00029-9
- Iamtham, W. P.-u. a. S. (2019). Extraction, purification and antioxidant activity of phycobiliprotein from *Arthrospira platensis*

Process Biochemistry

Volume 82, July 2019, Pages 189-198, 82, 189-198.

Jackman, R. W., & Kandarian, S. C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(4), C834-843. doi:

10.1152/ajpcell.00579.2003

Jagoe, R. T., & Goldberg, A. L. (2001). What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 4(3), 183-190. doi: 10.1097/00075197-200105000-00003

Jagoe, R. T., Redfern, C. P., Roberts, R. G., Gibson, G. J., & Goodship, T. H. (2002). Skeletal muscle mRNA levels for cathepsin B, but not components of the ubiquitin-proteasome pathway, are increased in patients with lung cancer referred for thoracotomy. *Clin Sci (Lond)*, 102(3), 353-361.

Johnson, M. L., Robinson, M. M., & Nair, K. S. (2013). Skeletal muscle aging and the mitochondrion. *Trends Endocrinol Metab*, 24(5), 247-256. doi: 10.1016/j.tem.2012.12.003

Kang SH, L. H., Kim M, Lee E, Sohn UD, Kim I. (2017). Forkhead box O3 plays a role in skeletal muscle atrophy through expression

of E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and atrogin-1 in Cushing's syndrome

AJP-Endocrinol Metab, 312, 495-507.

Kim, S. G., Kim, S. T., Wang, Y., Kim, S. K., Lee, C. H., Kim, K. K., . . . Kang, K. Y. (2010). Overexpression of rice isoflavone reductase-like gene (OsIRL) confers tolerance to reactive oxygen species. *Physiol Plant*, 138(1), 1-9. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01290.x

Klaude, M., Fredriksson, K., Tjäder, I., Hammarqvist, F., Ahlman, B., Rooyackers, O., & Wernerman, J. (2007). Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. *Clin Sci (Lond)*, 112(9), 499-506. doi: 10.1042/cs20060265

Korhone H, P. A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy*, 16(9), 945-960.

- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 40(1), 43-81. doi: 10.1080/10408690091189266
- Lagrand-Cantaloube, J., Offner, N., Csibi, A., Leibovitch, M. P., Batonnet-Pichon, S., Tintignac, L. A., . . . Leibovitch, S. A. (2008). The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *Embo j*, 27(8), 1266-1276. doi: 10.1038/emboj.2008.52
- Lassoued, I., Trigui, M., Ghlissi, Z., Nasri, R., Jamoussi, K., Kessis, M., . . . Barkia, A. (2014). Evaluation of hypocholesterolemic effect and antioxidant activity of Boops boops proteins in cholesterol-fed rats. *Food Funct*, 5(6), 1224-1231. doi: 10.1039/c3fo60705d
- Latres, E., Amini, A. R., Amini, A. A., Griffiths, J., Martin, F. J., Wei, Y., . . . Glass, D. J. (2005). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem*, 280(4), 2737-2744. doi: 10.1074/jbc.M407517200
- Li, H., Horke, S., & Förstermann, U. (2013). Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol Sci*, 34(6), 313-319. doi: 10.1016/j.tips.2013.03.007
- Li, Y. P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann, D. L., & Reid, M. B. (2005). TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *Faseb j*, 19(3), 362-370. doi: 10.1096/fj.04-2364com
- Li, Y. P., Chen, Y., Li, A. S., & Reid, M. B. (2003). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(4), C806-812. doi: 10.1152/ajpcell.00129.2003
- Liu, J., Jin, Y., Lin, S., Jones, G. S., & Chen, F. (2015). Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chem*, 175, 258-266. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.142
- Lockwood, B. (2007). *Nutraceuticals: A Guide for Healthcare Professionals*.

Pharmaceutical Press, 71(5), 99.

- López-Barrios, L., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. *J Food Sci*, 79(3), R273-283. doi: 10.1111/1750-3841.12365
- Man, W. D., Kemp, P., Moxham, J., & Polkey, M. I. (2009). Skeletal muscle dysfunction in COPD: clinical and laboratory observations. *Clin Sci (Lond)*, 117(7), 251-264. doi: 10.1042/cs20080659
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *Febs j*, 275(15), 3959-3970. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x
- Marinovic, A. C., Zheng, B., Mitch, W. E., & Price, S. R. (2007). Tissue-specific regulation of ubiquitin (UbC) transcription by glucocorticoids: in vivo and in vitro analyses. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292(2), F660-666. doi: 10.1152/ajprenal.00178.2006
- Marone, J. R., Falduto, M. T., Essig, D. A., & Hickson, R. C. (1994). Effects of glucocorticoids and endurance training on cytochrome oxidase expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 77(4), 1685-1690. doi: 10.1152/jappl.1994.77.4.1685
- Mecocci, P., Fanó, G., Fulle, S., MacGarvey, U., Shinobu, L., Polidori, M. C., . . . Beal, M. F. (1999). Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 26(3-4), 303-308. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00208-1
- Mitsui, T., Azuma, H., Nagasawa, M., Iuchi, T., Akaike, M., Odomi, M., & Matsumoto, T. (2002). Chronic corticosteroid administration causes mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *J Neurol*, 249(8), 1004-1009. doi: 10.1007/s00415-002-0774-5
- Nasri, M. (2017). Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. *Adv Food Nutr Res*, 81, 109-159. doi: 10.1016/bs.afnr.2016.10.003
- Nasri, R., Abdelhedi, O., Jemil, I., Daoued, I., Hamden, K., Kallel, C., . . . Karra-Châabouni, M. (2015). Ameliorating effects of goby fish protein hydrolysates on high-fat-high-fructose diet-induced hyperglycemia, oxidative stress and deterioration of kidney function in rats. *Chem Biol Interact*, 242, 71-80. doi:

10.1016/j.cbi.2015.08.003

Nasri, R., & Nasri, M. (2013). Marine-derived bioactive peptides as new anticoagulant agents: a review. *Curr Protein Pept Sci*, 14(3), 199-204. doi: 10.2174/13892037113149990042

Nimse S.B, P. D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006.

Okado-Matsumoto, A., & Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*, 276(42), 38388-38393. doi: 10.1074/jbc.M105395200

Orzechowski, A., Grizard, J., Jank, M., Gajkowska, B., Lokociejewska, M., Zaron-Teperek, M., & Godlewski, M. (2002). Dexamethasone-mediated regulation of death and differentiation of muscle cells. Is hydrogen peroxide involved in the process? *Reprod Nutr Dev*, 42(3), 197-216. doi: 10.1051/rnd:2002018

Orzechowski, A., Jank, M., Gajkowska, B., Sadkowski, T., Godlewski, M. M., & Ostaszewski, P. (2003). Delineation of signalling pathway leading to antioxidant-dependent inhibition of dexamethasone-mediated muscle cell death. *J Muscle Res Cell Motil*, 24(1), 33-53. doi: 10.1023/a:1024887431768

Oshima, Y., Kuroda, Y., Kunishige, M., Matsumoto, T., & Mitsui, T. (2004). Oxidative stress-associated mitochondrial dysfunction in corticosteroid-treated muscle cells. *Muscle Nerve*, 30(1), 49-54. doi: 10.1002/mus.20036

Pickart CM, E. M. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3), 55-72.

Preedy, V. R., Adachi, J., Ueno, Y., Ahmed, S., Mantle, D., Mullatti, N., . . . Peters, T. J. (2001). Alcoholic skeletal muscle myopathy: definitions, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis. *Eur J Neurol*, 8(6), 677-687. doi: 10.1046/j.1468-1331.2001.00303.x

Promklang D., P. N., Jarupat Maruo S., Tantiprasoplap S. (2018). Factors Associated with Sarcopenia Amongst Older Adults in Congested Communities in Bangkok. *Thai Journal of Nursing Council*, 33.

Pyne PK, B. P., Srivastav PP. (2017). Microalgae (Spirulina Platensis) and Its Bioactive Molecules: Review. *Indian J Nutri*, 4(2), 160.

- Ruiz-Ruiz J, D.-O. G., Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. (2013). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. *Food Biochemistry*, 37(1), 26-35.
- Saadia S, S. N., Anwarbc F, Abdul A, Hasanah H, Ghazalia M. (2015). Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, 33(1), 80-116.
- Salampessy, J., Phillips, M., Seneweera, S., Kailasapathy, k. (2009). Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia* sp.) insoluble proteins. *Food Chemistry*, 120(2), 556-560.
- Sandri, M. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*, 23, 160-170. doi: 10.1152/physiol.00041.2007
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., . . . Goldberg, A. L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117(3), 399-412. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00400-3
- Santilli, V., Bernetti, A., Mangone, M., & Paoloni, M. (2014). Clinical definition of sarcopenia. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 11(3), 177-180.
- Sayari, N., Sila, A., Haddar, A., Balti, R., Ellouz-Chaabouni, S., & Bougatef, A. (2016). Valorisation of smooth hound (*Mustelus mustelus*) waste biomass through recovery of functional, antioxidative and antihypertensive bioactive peptides. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23(1), 366-376. doi: 10.1007/s11356-015-5244-6
- Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyva, Y., Kline, W. O., . . . Glass, D. J. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*, 14(3), 395-403. doi: 10.1016/s1097-2765(04)00211-4
- Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R., & Culotta, V. C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem*, 276(41), 38084-38089. doi: 10.1074/jbc.M105296200
- Tiao, G., Fagan, J., Roegner, V., Lieberman, M., Wang, J. J., Fischer, J. E., & Hasselgren, P.

- O. (1996). Energy-ubiquitin-dependent muscle proteolysis during sepsis in rats is regulated by glucocorticoids. *J Clin Invest*, 97(2), 339-348. doi: 10.1172/jci118421
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J Food Sci*, 77(1), R11-24. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x
- Udenigwe, C. C., & Rouvinen-Watt, K. (2015). The Role of Food Peptides in Lipid Metabolism during Dyslipidemia and Associated Health Conditions. *Int J Mol Sci*, 16(5), 9303-9313. doi: 10.3390/ijms16059303
- von Haehling, S., Morley, J. E., & Anker, S. D. (2010). An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 1(2), 129-133. doi: 10.1007/s13539-010-0014-2
- Wang, L. S., Huang, J. C., Chen, Y. L., Huang, M., & Zhou, G. H. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of duck meat. *J Agric Food Chem*, 63(13), 3437-3444. doi: 10.1021/jf506120w
- Wang, Q., Huang, Y., Qin, C., Liang, M., Mao, X., Li, S., . . . Huang, Z. (2016). Bioactive Peptides from Angelica sinensis Protein Hydrolyzate Delay Senescence in *Caenorhabditis elegans* through Antioxidant Activities. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 8956981. doi: 10.1155/2016/8956981
- Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc*, 5(1), 51-66. doi: 10.1038/nprot.2009.197
- Williams, A., Sun, X., Fischer, J. E., & Hasselgren, P. O. (1999). The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. *Surgery*, 126(4), 744-749; discussion 749-750.
- Wu, R. M., Sun, Y. Y., Zhou, T. T., Zhu, Z. Y., Zhuang, J. J., Tang, X., . . . Shen, X. (2014). Arctigenin enhances swimming endurance of sedentary rats partially by regulation of antioxidant pathways. *Acta Pharmacol Sin*, 35(10), 1274-1284. doi: 10.1038/aps.2014.70
- Xie, F., Zhu, J., Hou, B., Wang, Y., Meng, F., Ren, Z., & Ren, S. (2017). Inhibition of NF- κ B activation improves insulin resistance of L6 cells. *Endocr J*, 64(7), 685-693. doi:

10.1507/endocrj.EJ17-0012

Xue, Z., Gao, J., Zhang, Z., Yu, W., Wang, H., & Kou, X. (2012). Antihyperlipidemic and antitumor effects of chickpea albumin hydrolysate. *Plant Foods Hum Nutr*, 67(4), 393-400. doi: 10.1007/s11130-012-0311-3

Yang, H., Menconi, M. J., Wei, W., Petkova, V., & Hasselgren, P. O. (2005).

Dexamethasone upregulates the expression of the nuclear cofactor p300 and its interaction with C/EBPbeta in cultured myotubes. *J Cell Biochem*, 94(5), 1058-1067. doi: 10.1002/jcb.20371

Yu, J., Hu, Y., Xue, M., Dun, Y., Li, S., Peng, N., . . . Zhao, S. (2016). Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysate of *Spirulina platensis*. *J Microbiol Biotechnol*, 26(7), 1216-1223. doi: 10.4014/jmb.1601.01033

ZHAN-PING ZHOU , L. N. L., XIU-LAN CHEN, JIN-XIA WANG, MIN CHEN ,YU-ZHONG ZHANG, BAI-CHENG ZHOU. (2005). FACTORS THAT EFFECT ANTIOXIDANT ACTIVITY OF C-PHYCOCYANINS FROM SPIRULINA PLATENSIS. *Food Biochemistry*, 29(3), 313-322.

Zhang, H., Yokoyama, W. H., & Zhang, H. (2012). Concentration-dependent displacement of cholesterol in micelles by hydrophobic rice bran protein hydrolysates. *J Sci Food Agric*, 92(7), 1395-1401. doi: 10.1002/jsfa.4713



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนเรศวร

การเตรียมสารเคมี

งานเพาะเลี้ยงสาหร่าย

องค์ประกอบในสูตรอาหาร Zarrouk's medium

สาร	กรัมต่อลิตร (g/L)
NaNO ₃	2.50 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
K ₂ SO ₄	1.00 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20 g
NaCl	1.00 g
CaCl ₂	0.04 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.08 g
สารละลาย A5	(1 มิลลิลิตรต่อลิตร)
สารละลาย B6	(1 มิลลิลิตรต่อลิตร)

หมายเหตุ: สารละลาย A5 (2.86 g H₃BO₃, 1.80 g MnCl₂·4H₂O, 0.22 g ZnSO₄·7H₂O, 0.08 g CuSO₄·5H₂O and 0.018 g MoO₃)

สารละลาย B6 (0.023 g NH₄VO₃, 0.048 g NiSO₄·7H₂O. 0.018 g Na₂WO₄·2H₂O and 0.044 g Co(NO₃)₂·6H₂O)

งาน Protein extraction

เตรียม stocking solution ของ 200 mM Sodium phosphate buffer

200 mM NaH_2PO_4 2.4 g/ 100 ml

200 mM Na_2HPO_4 2.8 g/ 100 ml

นำสารละลายทั้งสองมาผสมกันในอัตราส่วน 200 mM NaH_2PO_4 8.5 + 200 mM

Na_2HPO_4 91.5 ml (pH 7.8)

เจือจางที่ความเข้มข้น 20 mM Sodium phosphate buffer เพื่อใช้เป็น working solution

งาน Cell culture

Minimal essential Medium (MEM) completed media

MEM 100 ml

Fetal bovine serum 10 ml

Antibiotic 1 ml

Freezing media

Completed media 7 ml

20% Fetal bovine serum 2 ml

10% DMSO 1 ml

5 mg/ml MTT

MTT 5 mg

PBS 1 ml

ละลายให้เข้ากันแล้วกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 μm เก็บไว้ที่ 4 °C

1 mM Dexamethasone

Dexamethasone 3.9 mg

Sterilized water 10 ml

ละลายให้เข้ากันแล้วกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 μm เก็บไว้ที่ -20 °C

งาน DNA

2% Agarose gel

Agarose	2	g
1X TAE buffer	100	ml

DCHF-DA assay

1 M DCFH-DA (1 ml)	0.53	mg
ละลายด้วย 100% DMSO	1	ml
เตรียมเป็น working solution ใหม่ทุกครั้ง		

