



ฤทธิ์ของสารสกัดสำหรับอาร์โธรสไปรา ฟลาเทินซิส ต่อการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อ L6  
จากภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



สิริลักษณ์ สันเสนาะ

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนครสวรรค์  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมี  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนครสวรรค์

ฤทธิ์ของสารสกัดสารห่วยอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิส ต่อการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อ L6  
จากภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมี  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ฤทธิ์ของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิส ต่อการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อ  
หนู L6 จากภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์"

ของ สิริลักษณ์ สันเสนาะ

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

### คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์  
(ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณ์ ตันตนะรัตน์)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สะการะ ตันโสภณ)

อนุมัติ

.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

<b>ชื่อเรื่อง</b>	ฤทธิ์ของสารสกัดสำหรับารโรธสไปร่า พลาเทินซิส ต่อการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อ L6 จากภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
<b>ผู้วิจัย</b>	สิริลักษณ์ สันเสนาะ
<b>ประธานที่ปรึกษา</b>	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณ์ ตันตนะรัตน์
<b>กรรมการที่ปรึกษา</b>	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา
<b>ประเภทสารนิพนธ์</b>	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2564
<b>คำสำคัญ</b>	สำหรับารโรธสไปร่า พลาเทินซิส, เซลล์กล้ามเนื้อ, สารต้านอนุมูลอิสระ, ความเครียดออกซิเดชัน

### บทคัดย่อ

การสะสมของสารอนุมูลอิสระซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์กล้ามเนื้อเป็นสาเหตุหนึ่งของการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อ การช่วยฟื้นฟูกล้ามเนื้อทำได้โดยการเติมสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยชะลอการสะสมของสารอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดจากสำหรับารโรธสไปร่า พลาเทินซิส มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงมีการดำเนินการวิจัย โดยเปรียบเทียบสารสกัดที่ได้จากกระบวนการสกัด 3 วิธี คือ การแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียง (SC) การแช่เยือกแข็งละลาย (FT) และการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียม (ASE) แล้วจึงนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay จากนั้นจึงศึกษาความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการฟื้นฟูกล้ามเนื้อหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด วัดปริมาณอนุมูลอิสระที่สะสมอยู่ภายในเซลล์และการแสดงออกของ SIRT1 ที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงการฟื้นฟูกล้ามเนื้อ โดยผลการทดลองพบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 33.4%, 49.9%, และ 11.9% ตามลำดับ และมีค่า LD50 หรือความเข้มข้นสูงสุดที่เซลล์มีอัตราการรอด 50% เท่ากับ 750 µg/ml, 1,400 µg/ml และ 800 µg/ml ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ในการฟื้นฟูกล้ามเนื้อหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฟื้นฟูกล้ามเนื้อได้เท่ากับ 150 µg/ml, 75 µg/ml และ 125 µg/ml ตามลำดับ วัดปริมาณอนุมูลอิสระด้วย DCFH-Da ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการลดอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วย DCFH-Da ซึ่งค่าที่ได้เทียบกับกลุ่มทริท H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันไม่แตกต่างกันมีอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ วัดปริมาณการแสดงออกโปรตีน SIRT1 ของสาร SC ค่าสูงสุด 510.89%±210.6 และสาร FT 466.67%± 120.97 ที่ความเข้มข้น 150 µg/ml เทียบกับกลุ่มเซลล์ปกติ และการวัดปริมาณ ATP สาร SC มีค่า 0.202±0.43 µM ที่ความเข้มข้น 75 µg/ml และสาร FT 0.228 ±0.02 µM ที่ความ

เข้มข้น 150  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดแบบแช่เยือกแข็งละลายมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและช่วยชะลอการสูญเสียกล้ามเนื้อได้



<b>Title</b>	RECOVERY EFFECT OF <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> EXTRACTS ON L6 RAT MUSCLE CELLS BY HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED OXIDATIVE STRESS.
<b>Author</b>	SIRILUK SANSANOR
<b>Advisor</b>	Assistant Professor Krit Tantanarat, Ph.D.
<b>Co-Advisor</b>	Assistant Professor Amnat Phetrungnapha, Ph.D.
<b>Academic Paper</b>	M.S. Thesis in Biochemistry, Naresuan University, 2021
<b>Keywords</b>	Arthrospira platensis rat skeletal muscle cells antioxidants oxidative stress

### ABSTRACT

A buildup of free radical, which can induce oxidative stress inside muscle cells, is one of the causes of muscle loss. Muscle recovery can be achieved by adding antioxidants to maintain low level of free radicals in which extracts of *Arthrospira platensis* have such antioxidant activity. This experiment was conducted to compare 3 algal extracts by using different extraction methods including sonication (SC), freeze thaw (FT) and ammonium sulphate precipitation (ASE). The extracts were examined by their antioxidant activity using DPPH assay, toxicity to muscle cells and recovery effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducing oxidative stress in muscle cells. The results showed that antioxidant activity of the 3 extracts were 33.4%, 49.9%, and 11.9%, respectively. LD<sub>50</sub> or the highest concentration that exhibited the cell survival rate of 50% of the 3 extracts were 750 µg/ml, 1,400 µg/ml and 800 µg/ml, respectively. It was also found that all 3 extracts had muscle recovery effect after oxidative stress induction. The lowest concentration of the 3 extracts that can achieve muscle recovery were 150 µg/ml, 75 µg/ml and 125 µg/ml, respectively. The free radical content was measured by DCFH-Da of the three extracts. No free radical-reducing activity was found with DCFH-Da, where the values obtained compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group were not statistically significant. The protein expression SIRT1 was 510.89%±210.6 of SC and 466.67%± 120.97 of FT at a concentration of 150 µg/ml compared to the control group. And measurement of ATP, SC, 0.202 ± 0.43 µM at a

concentration of 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and FT  $0.228 \pm 0.02 \mu\text{M}$  at a concentration of 150  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . The extract from freeze thaw process showed a promising sign and can be used as an ingredient for dietary supplements to promote antioxidant activity and alleviation of muscle wasting.



## ประกาศคุณูปการ

การทำวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีนั้น ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ ดร.สรารุช สัตยาก็ และ ผศ.ดร.กฤษณ์ ต้นตนะรัตน์อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คอยชี้แนะในเรื่องต่างๆรวมถึงให้คำปรึกษาตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการทำวิจัย ขอขอบคุณ ผศ.ดร.สะการะ ต้นโสภณ กรรมการสอปร.โครงการวิทยานิพนธ์ และกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน และดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ประธานกรรมการสอปร.วิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลามาให้คำแนะนำแนวทางการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย รวมทั้งเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณทุนเรียนดีของคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณสมาชิก CELEB และ APlab นางสาวนลินนิภา เวียงนาผู้สอนเทคนิคการทำแล็บ และทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ บัณฑิตศึกษาภาควิชาชีวเคมีที่คอยให้คำแนะนำและอยู่เป็นเพื่อนร่วมทุกข์ร่วมสุขตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุน เป็นทั้งแรงกายแรงใจในการศึกษาเล่าเรียน และบุคคลที่เป็นแรงกำลังใจแรงบันดาลใจที่เป็นส่วนสำคัญที่สุดที่ทำให้มีกำลังใจในการทำวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณตัวผู้วิจัยเองที่อดทนและตั้งใจในการศึกษาเล่าเรียนจนบรรลุถึงความสำเร็จ

สิริลักษณ์ สันเสนาะ



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตการวิจัย.....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
สมมุติฐานของการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. ระบบกล้ามเนื้อ (Muscular system).....	5
2. การพัฒนาของระบบกล้ามเนื้อ (Development of the muscular system).....	8
3. การสูญเสียมวลของกล้ามเนื้อ.....	9
4. <i>Arthrospira platensis</i> .....	13

5. Phycocyanin.....	16
6. อนุมูลอิสระ (Free radical) .....	18
7. L6 skeletal muscle cell .....	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย .....	22
1. การเลี้ยงเซลล์สำหรับอาร์โธรสไปรา ปลาเท็นซีส .....	22
2. การสกัดสารจากสำหรับอาร์โธรสไปรา ปลาเท็นซีส .....	23
2.1 การแตกเซลล์ด้วยการแช่เยือกแข็งละลาย (Freeze thaw).....	23
2.2 การแตกเซลล์ด้วยการแช่เยือกแข็งละลาย (Freeze thaw) และการตกตะกอน ด้วย Ammonium sulphate.....	23
2.3 นำมาสกัดโดยใช้โซนิเคเตอร์ .....	24
3. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี DPPH Assay.....	24
4. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการอยู่รอดและความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อ .....	24
5. ทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี DCHF Da Assay.....	25
6. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟื้นฟูเซลล์หลังจากการเกิด oxidative stress ใน เซลล์กล้ามเนื้อ (%Recovery).....	25
7. ศึกษารูปร่างของเซลล์จากการได้รับสารสกัดต่อการฟื้นฟูเซลล์หลังจากการเกิด oxidative stress ในเซลล์กล้ามเนื้อ .....	26
8. การวัดปริมาณโปรตีน SIRT 1 โดย SIRT 1 Assay kit.....	26
9. การวัดปริมาณ ATP โดย ATP Assay kit .....	27
10. วิเคราะห์ข้อมูล.....	27
บทที่ 4 ผลการวิจัย .....	28
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสำหรับอาร์โธรสไปรา ปลาเท็นซีสโดย วิธี DPPH assay.....	28

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิสในเซลล์กล้ามเนื้อหนู	30
การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสำหรับอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิสต่อการฟื้นฟูกล้ามเนื้อหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน	32
ผลการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี DCHF Da Assay	35
ผลการวัดปริมาณโปรตีน SIRT 1 โดย SIRT 1 Assay kit	37
ผลการวัดปริมาณ ATP โดย ATP Assay kit	39
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	41
อภิปรายผล	41
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสำหรับอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิสโดยวิธี DPPH assay	41
ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการอยู่รอดและความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนู	41
การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสำหรับอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิสต่อการฟื้นฟูกล้ามเนื้อหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน	42
การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี DCHF Da Assay	42
การวัดปริมาณโปรตีน SIRT 1 โดย SIRT 1 Assay kit	43
การวัดปริมาณ ATP โดย ATP Assay kit	44
สรุปผลการวิจัย	45
บรรณานุกรม	47
ประวัติผู้วิจัย	52

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย <i>S. platensis</i> และ <i>S. maxima</i> .....	13
ตาราง 2 คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่าย <i>S. platensis</i> (ส่วนประกอบ 100 กรัมของ น้ำหนักแห้ง) .....	15
ตาราง 3 ตัวอย่างของ RS โดยแบ่งประเภทตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation และแบ่งย่อยโดยลักษณะของการ เป็น radical ของโมเลกุล.....	20
ตาราง 4 องค์ประกอบในสูตรอาหาร Zarrouk's medium.....	22
ตาราง 5 ผลผลิตสารสกัดที่ได้อ้อยละของน้ำหนักแห้ง (%).....	28
ตาราง 6 สรุปภาพรวมของผลการทดลองของสารสกัด .....	46

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 ภาพรวมการดำเนินการศึกษา .....	4
ภาพ 2 ลักษณะชนิดของกล้ามเนื้อ (Types of muscle).....	6
ภาพ 3 ลักษณะของกล้ามเนื้อลาย (Striated Muscle muscle).....	7
ภาพ 4 โครงสร้างของกล้ามเนื้อลาย (Striated Muscle muscle).....	7
ภาพ 5 การพัฒนาของกล้ามเนื้อลาย .....	8
ภาพ 6 การเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อลาย .....	9
ภาพ 7 การลดลงของมวลกล้ามเนื้อเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น .....	11
ภาพ 8 Path way การควบคุมและกระตุ้น Sirt1.....	12
ภาพ 9 <i>Arthrospira platensis</i> .....	14
ภาพ 10 แบบจำลองการจัดเรียงตัวของไฟโคบิลิโซม (a) แสดงการเชื่อมต่อระหว่างไฟโคบิลิโซมกับเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ และ (b) แสดงตำแหน่งการจัดเรียงตัวของ 3 องค์ประกอบหลักในไฟโคบิลิโซม .....	17
ภาพ 11 <i>Phycocyanin</i> .....	18
ภาพ 12 <i>L6 myoblast cell</i> .....	21
ภาพ 13 การ <i>differentiation</i> จากเซลล์ <i>L6 myoblast cell</i> เป็น <i>myotube cell</i> .....	21
ภาพ 14 เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) ด้วยการทดสอบ DPPH assay ของสารสกัด SC ความเข้มข้น 100, 500, 1,000, 1,500, 2,000 µg/ml.....	29
ภาพ 15 เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) ด้วยการทดสอบ DPPH assay ของสารสกัด FT ความเข้มข้น 100, 500, 1,000, 1,500, 2,000 µg/ml .....	29

ภาพ 16	เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) ด้วยการทดสอบ DPPH assay ของสารสกัด ASE ความเข้มข้น 100, 500, 1,000, 1,500, 2,000 µg/ml.....	30
ภาพ 17	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อในสารสกัด SC ความเข้มข้น 0 – 1,500 µg/ml.....	31
ภาพ 18	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อในสารสกัด FT ความเข้มข้น 0 – 1,500 µg/ml.....	31
ภาพ 19	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อในสารสกัด ASE ความเข้มข้น 0 – 1,500 µg/ml.....	32
ภาพ 20	เซลล์กล้ามเนื้อหุ้มด้วย crystal violet ภาพใต้อกล้องจุลทรรศน์ที่ความขยาย 40x ประกอบด้วย เซลล์ปกติ (A), เซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (B) และเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและได้รับสารสกัด SC ที่ความ 25 – 1,500 µg/ml (C) - (N).....	33
ภาพ 21	เซลล์กล้ามเนื้อหุ้มด้วย crystal violet ภาพใต้อกล้องจุลทรรศน์ที่ความขยาย 40x ประกอบด้วย เซลล์ปกติ (A), เซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (B) และเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและได้รับสารสกัด FT ที่ความ 25 – 1,500 µg/ml (C) - (N).....	34
ภาพ 22	เซลล์กล้ามเนื้อหุ้มด้วย crystal violet ภาพใต้อกล้องจุลทรรศน์ที่ความขยาย 40x ประกอบด้วย เซลล์ปกติ (A), เซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (B) และเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและได้รับสารสกัด ASE ที่ความ 25 – 1,500 µg/ml (C) - (N).....	35
ภาพ 23	เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DCHF Da ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด SC ความเข้มข้น 0 -1,500 µg/ml.....	36
ภาพ 24	เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DCHF Da ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด FT ความเข้มข้น 0 -1,500 µg/ml.....	37

ภาพ 25	เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุโมลิสระโดยวิธี DCHF Da ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด PC ความเข้มข้น 0 -1,500 $\mu\text{g/ml}$ .....	37
ภาพ 26	เปอร์เซ็นต์การวัดปริมาณโปรตีน SIRT 1 ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด SC ความเข้มข้น 0 -500 $\mu\text{g/ml}$ .....	38
ภาพ 27	เปอร์เซ็นต์การวัดปริมาณโปรตีน SIRT 1 ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด FT ความเข้มข้น 0 -500 $\mu\text{g/ml}$ .....	39
ภาพ 28	เปอร์เซ็นต์การวัดปริมาณ ATP ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด SC ความเข้มข้น 0 -500 $\mu\text{g/ml}$ .....	40
ภาพ 29	เปอร์เซ็นต์การวัดปริมาณ ATP ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด FT ความเข้มข้น 0 -500 $\mu\text{g/ml}$ .....	40
ภาพ 30	ภาพรวมของงานวิจัย .....	46



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันพบการสูญเสียมวลของกล้ามเนื้อ และความแข็งแรงของกล้ามเนื้อสูงขึ้นในผู้สูงอายุ ซึ่งภาวะนี้ถือเป็นกลุ่มอาการของผู้สูงอายุ (Geriatric Syndrome) ที่พบบ่อยถึง 1 ใน 3 ของผู้สูงอายุทั่วไป ความแข็งแรงและมวลกล้ามเนื้อลดลงตามวัย เมื่ออายุเพิ่มขึ้นนั้นส่งผลให้เกิดการลดลงของ anabolic hormones จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนในกล้ามเนื้อลดลง และหนึ่งในปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงคือการสะสมของ ROS โดยพบว่าในเนื้อเยื่อของคนที่อยู่ในวัยสูงอายุจะมีการสร้างอนุมูลอิสระมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Fulle et al., 2004) ส่งผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ ROS สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จนเกิดเป็นผลกระทบต่อเนื่องไม่ว่าจะเป็น Lipid peroxidation, Protein Oxidation หรือ DNA oxidation (Kondo et al., 1994) และยิ่งไปกว่านั้น ROS ยังเป็นต้นเหตุให้เกิดการสลายของกล้ามเนื้อผ่านการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน จึงทำให้ผู้สูงอายุหลายคนจึงประสบกับปัญหาภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยที่อาจส่งผลต่อการใช้ชีวิตประจำวัน โดยทั่วไปคนเราจะมีมวลกล้ามเนื้อสูงที่สุด (Peak Muscle Mass) ที่ช่วงอายุ 30-40 ปี หลังจากอายุ 40 ปี มวลกล้ามเนื้อก็จะเริ่มลดลงร้อยละ 1-2 ต่อปี ในช่วงแรกอาจจะยังไม่เห็นถึงความเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อมีอายุช่วง 50-60 ปี ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อก็จะลดลงด้วย ประมาณร้อยละ 1.5 ต่อปี และลดลงเร็วขึ้นตามอายุที่เพิ่มสูงขึ้น จนเริ่มมีผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวันหลังอายุ 65 ปี ดังนั้นการรักษาฟื้นฟูกล้ามเนื้อที่เกิดจากการสะสมปริมาณอนุมูลอิสระในผู้สูงอายุจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ และในปัจจุบันก็มีผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพของผู้สูงอายุเป็นจำนวนมาก ซึ่งผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาสารสกัดจากสาหร่ายอาร์โธรสไปราพลาเท็นซิส

สาหร่ายอาร์โธรสไปรา พลาเท็นซิส (*Arthrospira platensis*, *A. platensis*) หรือสาหร่ายเกลียวทอง เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) มีลักษณะเป็นเกลียว สาหร่ายเกลียวทอง เกิดขึ้นตามธรรมชาติในทะเลสาบเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนที่มีค่า pH สูง และมีความเข้มข้นของคาร์บอนเนตและไบคาร์บอนเนตสูง *A. platensis* พบในแอฟริกา เอเชียและอเมริกาใต้ สาหร่ายชนิดนี้มีมูลค่าทางการค้าขนาดใหญ่ เป็นแหล่งอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูง มีช่วงระหว่าง 50-70% ของน้ำหนักแห้ง (Kissoudi et al., 2018). ยิ่งไปกว่านั้นยังมีสัดส่วนของกรดอะมิโนจำเป็น (ร่างกายสร้างไม่ได้) ในปริมาณสูง มีกรดอะมิโนมากถึง 18 ชนิด มีวิตามินที่มีคุณค่าต่าง ๆ มากมาย และยังมีอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอันโดดเด่นที่ช่วยในการส่งเสริมสุขภาพ ไม่ว่าจะเป็นกรดไขมัน  $\gamma$ -



linolenic acid (GLA), สาร Antioxidant อย่าง  $\beta$ -carotene และ Phycocyanin หรือพอลิแซคคาไรด์ และสารร้ายเกลียวทอง ได้รับการยอมรับในวงการแพทย์ว่ามีคุณค่าทางโภชนาการที่ดี เป็นแหล่งอาหารเพื่อสุขภาพ เพิ่มภูมิคุ้มกันและฟื้นฟูระบบการทำงานของร่างกาย ส่งเสริมให้สุขภาพดีขึ้น ยังใช้สำหรับการลดน้ำหนัก, โรคสมาธิสั้น (ADHD), เบาหวาน, ความเครียดความเหนื่อยล้าความวิตกกังวลซึมเศร้า เป็นต้น การใช้ประโยชน์โดยมนุษย์ (Vonshak, 1997). สามารถทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (Ciferri, 1983). นำมาใช้ในทางการแพทย์สำหรับผู้ป่วยที่มีปัญหาในการเคี้ยวหรือกลืนอาหาร (Adiba et al., 2008). การรักษาโรคมะเร็งบางชนิด โรคภูมิแพ้ และโรคโลหิตจางเช่นเดียวกับตับเป็นพิษและโรคหลอดเลือด (Asghari et al, 2016). ยังเป็นอาหารสัตว์ที่เพิ่มให้สัตว์มีสุขภาพดี

ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin : PC) เป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่มีรงควัตถุ (Chromophore) เกาะอยู่บนโมเลกุล มีคุณสมบัติเป็นสารที่มีสีฟ้า เรืองแสงได้ ละลายได้ดีในน้ำ ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในด้านทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย เช่น ฤทธิ์ต่อการสมานแผล การป้องกันการเกิดโรคตับจากสารพิษ ป้องกันผิวหนังจาก Oxidative stress และการป้องกันเซลล์ประสาทจากภาวะสมองขาดเลือด เป็นต้น (Kuddus et al., 2012; Kannaujiya et al., 2016) และนอกจากนี้ยังมีการนำไปพัฒนาเป็นอุตสาหกรรมอาหารเสริม อาหารบำรุงร่างกายชนิดต่าง ๆ และยังมีมีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตอาหารสัตว์อีกด้วย ซึ่งปัจจุบัน Phycocyanin มีมูลค่าทางการค้าที่สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากกระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์มีต้นทุนสูง ราคาของ PC อยู่ที่ประมาณ 10-50 เหรียญสหรัฐต่อมิลลิกรัม (Kuddus et al., 2012; Kannaujiya et al., 2016) การเพาะเลี้ยง *A. platensis* ในเชิงพาณิชย์มีอย่างแพร่หลายเพื่อจำหน่ายเป็นอาหารเสริมจาก *A. platensis* จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของสารออกฤทธิ์จากสาหร่าย *A. platensis* และจะช่วยเพิ่มมูลค่าของสาหร่าย *A. platensis*

ดังนั้นผู้วิจัยสนใจที่จะทำการศึกษาสารสกัดจากสาหร่าย *A. platensis* ที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อช่วยในการลดปริมาณอนุมูลอิสระในเซลล์กล้ามเนื้อ ช่วยฟื้นฟูกล้ามเนื้อให้แข็งแรงขึ้น และศึกษาผลของสารสกัดสาหร่าย *A. platensis* ต่อการแสดงออกของ SIRT1 โดยศึกษาจากการวัดปริมาณโปรตีน SIRT1 ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงเซลล์มีการฟื้นฟูโดยในเซลล์ปกติจะมีการแสดงออกอยู่แล้ว ถ้าหากเซลล์เกิดความเสียหายจะมีการแสดงออกของโปรตีน SIRT1 ที่เพิ่มขึ้นซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้าของ คุณ Seo และคณะในการวัดปริมาณการทำงานของ SIRT1 (Seo. et al., 2018). สามารถช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ และการพัฒนาเซลล์กล้ามเนื้อ และมีความสำคัญในการรักษากล้ามเนื้อที่เสียหายได้

### จุดมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์สารสกัดทั้ง 3 แบบ ของสาหร่าย *Arthrospira platensis*  
เพื่อศึกษาผลของสารสกัดสาหร่าย *Arthrospira platensis* ในการลดปริมาณอนุมูลอิสระใน  
เซลล์กล้ามเนื้อหนู L6  
เพื่อศึกษาผลของสารสกัดสาหร่าย *Arthrospira platensis* ต่อการแสดงออกของ SIRT1

### ความสำคัญของการวิจัย

เพื่อสร้างเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพจากสารสกัดสาหร่าย *Arthrospira platensis* ในการฟื้นฟูกล้ามเนื้อ และลดปริมาณอนุมูลอิสระในกล้ามเนื้อ

### ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาสาหร่าย *Arthrospira platensis* TISTR 8217 เลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk's medium วงจรแสง: ความมืด (12:12) ชั่วโมง และให้อากาศโดยใช้ปั๊มลม เลี้ยงเซลล์สาหร่ายเป็นระยะเวลา 25 วัน เพื่อทำการสกัดสาร และทำการศึกษาในเซลล์ไลน์เซลล์กล้ามเนื้อ L6 ที่ได้รับอนุมูลอิสระ  $H_2O_2$  เป็นการจำลองสภาวะกล้ามเนื้อที่มีการสะสมอนุมูลอิสระ ศึกษาการลดปริมาณอนุมูลอิสระในเซลล์กล้ามเนื้อหนู L6 ผ่าน pathway ของ SIRT1

### ข้อตกลงเบื้องต้น

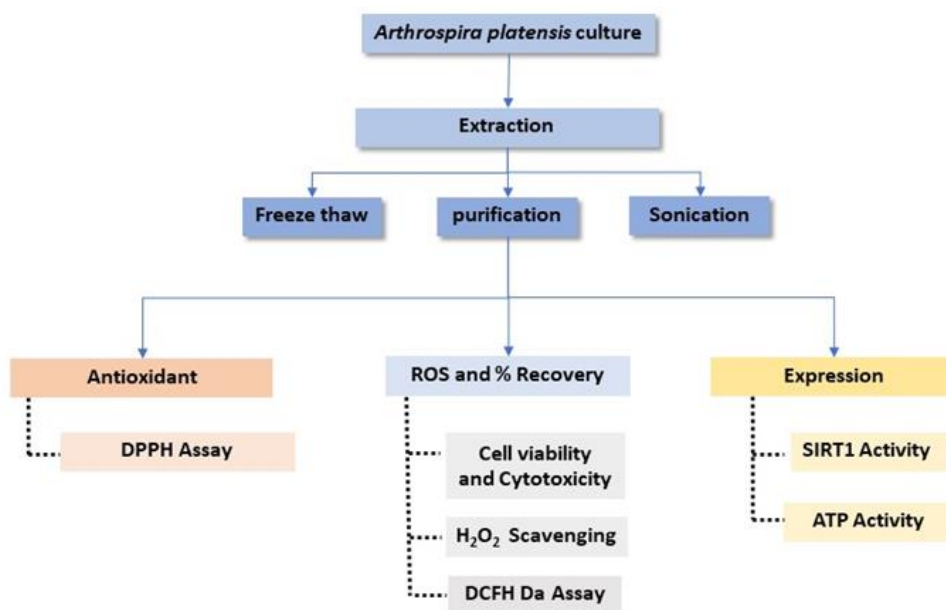
สาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิส ได้รับการรับรองจาก FDA (Food and Drug Administration) ว่าไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ และสามารถใช้เป็นอาหารเสริมในมนุษย์ได้อย่างถูกกฎหมาย

### นิยามศัพท์เฉพาะ

สารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิส, เซลล์กล้ามเนื้อหนู, สารต้านอนุมูลอิสระ

### สมมุติฐานของการวิจัย

สารสกัดจากสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิส มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดอนุมูลอิสระ และช่วยลดปริมาณอนุมูลอิสระหลังจากการเกิด Oxidative stress ในเซลล์กล้ามเนื้อได้



ภาพ 1 ภาพรวมการดำเนินการศึกษา



## บทที่ 2

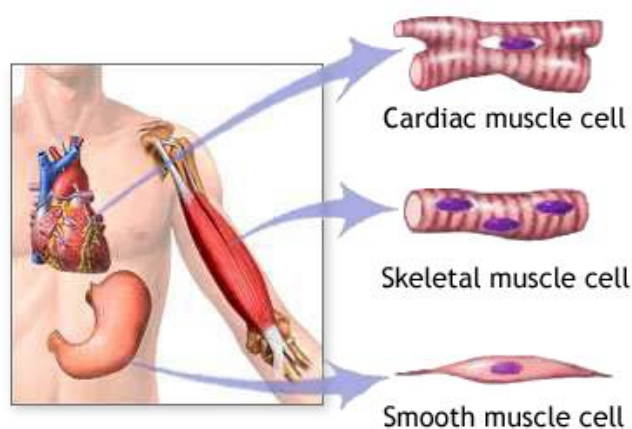
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. ระบบกล้ามเนื้อ (Muscular system)

##### 1.1 กล้ามเนื้อ (Muscle)

กล้ามเนื้อ (Muscle) เป็นเนื้อเยื่อที่หดตัวได้ในร่างกาย เปลี่ยนแปลงมาจากเมโซเดิร์ม (mesoderm) ของชั้นเนื้อเยื่อในตัวอ่อน และเป็นระบบหนึ่งของร่างกายที่สำคัญต่อการเคลื่อนไหวทั้งหมดของร่างกาย ซึ่งกล้ามเนื้อเป็นส่วนประกอบใหญ่ของร่างกายมนุษย์ และเป็นส่วนสำคัญที่สุด กล้ามเนื้อในร่างกายทั้งหมดมีน้ำหนักประมาณ 2/5 ของน้ำหนักตัว ร่างกายแบ่งกล้ามเนื้อออกเป็น 3 ชนิด คือ กล้ามเนื้อยึดกระดูกหรือกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle or striated muscle), กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) และกล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle) โดยที่กล้ามเนื้อลายนั้นถูกควบคุมอยู่ภายใต้อำนาจจิตใจหรือรีเฟล็กซ์ ส่วนกล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อหัวใจทำงานนอกอำนาจจิตใจ โดยกล้ามเนื้อนั้นมีทำหน้าที่หดตัวเพื่อให้เกิดแรงและทำให้เกิดการเคลื่อนที่ (motion) รวมถึงการเคลื่อนที่และการหดตัวของอวัยวะภายใน ซึ่งกล้ามเนื้อจำนวนมากหดตัวได้นอกอำนาจจิตใจ และจำเป็นต่อการดำรงชีวิต เช่น การบีบตัวของหัวใจ หรือการบีบรัด (peristalsis) ทำให้เกิดการผลักดันอาหารเข้าไปภายในทางเดินอาหาร การหดตัวของกล้ามเนื้อที่อยู่ใต้อำนาจจิตใจมีประโยชน์ในการเคลื่อนที่ของ ร่างกาย และสามารถควบคุมการหดตัวได้ เช่นการกลอกตา หรือการหดตัวของกล้ามเนื้อควอดริเซ็บ (quadriceps muscle) ที่ต้นขา

ใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) ที่อยู่ใต้อำนาจจิตใจแบ่งกว้างๆ ได้เป็น 2 ประเภทคือ กล้ามเนื้อ fast twitch และกล้ามเนื้อ slow twitch กล้ามเนื้อ slow twitch สามารถหดตัวได้เป็นระยะเวลานานแต่ให้แรงน้อย ในขณะที่กล้ามเนื้อ fast twitch สามารถหดตัวได้รวดเร็วและให้แรงมากแต่ล้าได้ง่าย



ADAM.

ภาพ 2 ลักษณะชนิดของกล้ามเนื้อ (Types of muscle)

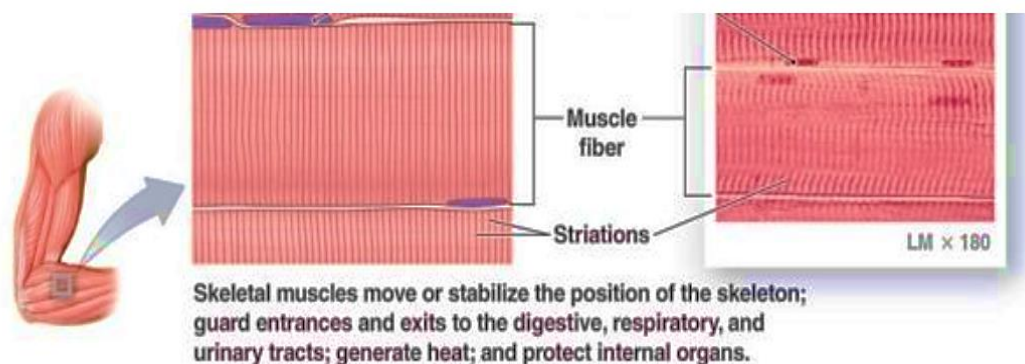
ที่มา: <http://www.6aming.com>

กล้ามเนื้อลาย (Striated Muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่พบมากที่สุดในร่างกายโดยจะยึดเกาะอยู่กับกระดูกทั่วทุกส่วนของร่างกาย เช่น แขน ขา ลำตัว ใบหน้า ทำให้เราสามารถเคลื่อนไหวส่วนต่าง ๆ อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า กล้ามเนื้อยึดกระดูกหรือกล้ามเนื้อโครงร่าง (Skeletal Muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่ทำงานอยู่ภายใต้อำนาจจิตใจ กล้ามเนื้อลายประกอบด้วยเซลล์ลักษณะเป็นเส้นยาวจึงเรียกว่า ไยกล้ามเนื้อ (Muscle fiber) ความยาวของใยกล้ามเนื้อจะเท่ากับมัดกล้ามเนื้อที่ใยกล้ามเนื้อนั้นเป็นองค์ประกอบอยู่ใยกล้ามเนื้อมีลายตามขวางและมีเยื่อหุ้มเซลล์เรียกว่า ซาร์โคเลมมา (Sarcolemma) ซึ่งมีเนื้อเยื่อประสานหุ้มอีกชั้นหนึ่งเรียกว่า เอนโดไมเซียม (Endomysium) ใยของกล้ามเนื้อลายมีนิวเคลียสหลายอันอยู่ด้านข้างของเซลล์ เรียงตัวกันเป็นระยะตลอดแนวความยาวของเซลล์ แต่ละเซลล์มีปลายประสาทมาเลี้ยง เพื่อกระตุ้นให้เกิดการหดตัว ใยกล้ามเนื้อลายประกอบด้วยเส้นใยขนาดเล็กเรียกว่า ไมโอไฟบริล (Myofibril) แต่ละไมโอไฟบริลประกอบด้วยฟิลาเมนต์ (filament) ซึ่งมี 2 ชนิด คือ

1.) ฟิลาเมนต์ชนิดหนา (Thick Filament) ประกอบด้วยโปรตีนซึ่งเรียกว่า ไมโอซิน (Myosin) รวมตัวกันเป็นมัด โดยแต่ละมัดประกอบด้วยโมเลกุลของไมโอซินที่เกิดจากโปรตีน 2 สายพันกันเป็นเกลียวตรงปลายสุดของแต่ละสายจะม้วนตัวเป็นก้อนกลมคล้ายตะขอ

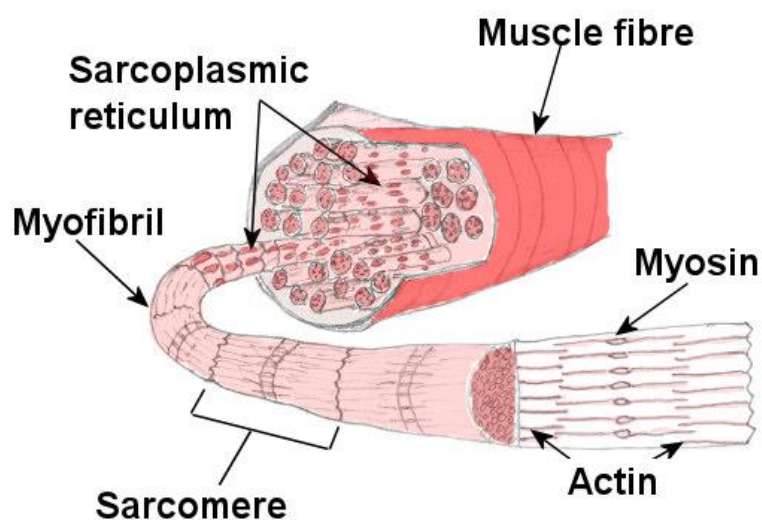


2.) ฟิลาเมนต์ชนิดบาง (Thin Filament) ประกอบด้วยโปรตีนซึ่งเรียกว่า แอกทิน (Actin) ที่มีลักษณะเป็นก้อนกลม (Globular Actin Molecules) เรียงต่อกันเป็นสายยาวที่พันกันเป็นเกลียว



ภาพ 3 ลักษณะของกล้ามเนื้อลาย (Striated Muscle muscle)

ที่มา: <http://www.6aming.com>



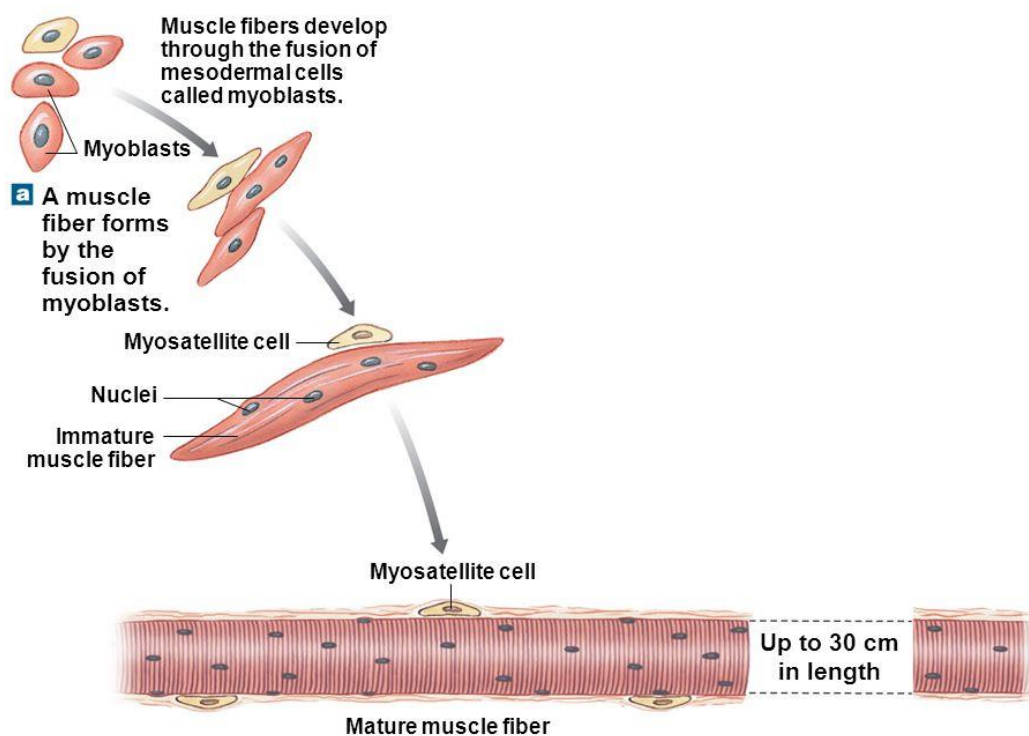
ภาพ 4 โครงสร้างของกล้ามเนื้อลาย (Striated Muscle muscle)

ที่มา: <http://www.6aming.com>

## 2. การพัฒนาของระบบกล้ามเนื้อ (Development of the muscular system)

การเจริญของกล้ามเนื้อลาย เซลล์กล้ามเนื้อเจริญมาจาก mesoderm กล้ามเนื้อลาย เกิดขึ้นทั้งหมดร่างกายเจริญมาจาก myotome ของ somite และบางส่วนเจริญมาจาก bronchial arches ซึ่งเซลล์เริ่มต้นของเซลล์กล้ามเนื้อในระยะตัวอ่อน มีลักษณะเป็น mononucleated cell และรูปกระสวย ที่มีการแบ่งตัวเรื่อย ๆ และต่อมา ส่วนต่าง ๆ ใน cytoplasm ของเซลล์จะเปลี่ยนไป มี myofibrillar protein พอร์มขึ้น หยุดการแบ่งตัวแบบ mitosis เซลล์นี้เรียกว่า “myoblast” ต่อมา cytoplasm ของ myoblast หลายๆเซลล์จะมาเชื่อมกัน ได้เป็น myotubule มีลักษณะ multinucleated และ nuclei เรียงตัวกันในลักษณะเป็นลูกโซ่ไม่มี contractile filament พอร์มขึ้น คือ actin และ myosin เมื่อเซลล์เจริญขึ้น contractile filament จัดตัวกันเป็น banding (cross-striated) และ nucleus ถูกเบียดไปอยู่ที่ขอบ กลายเป็น skeletal muscle fiber ดังภาพที่ 6

Figure 10-2a The Formation of a Multinucleate Skeletal Muscle Fiber

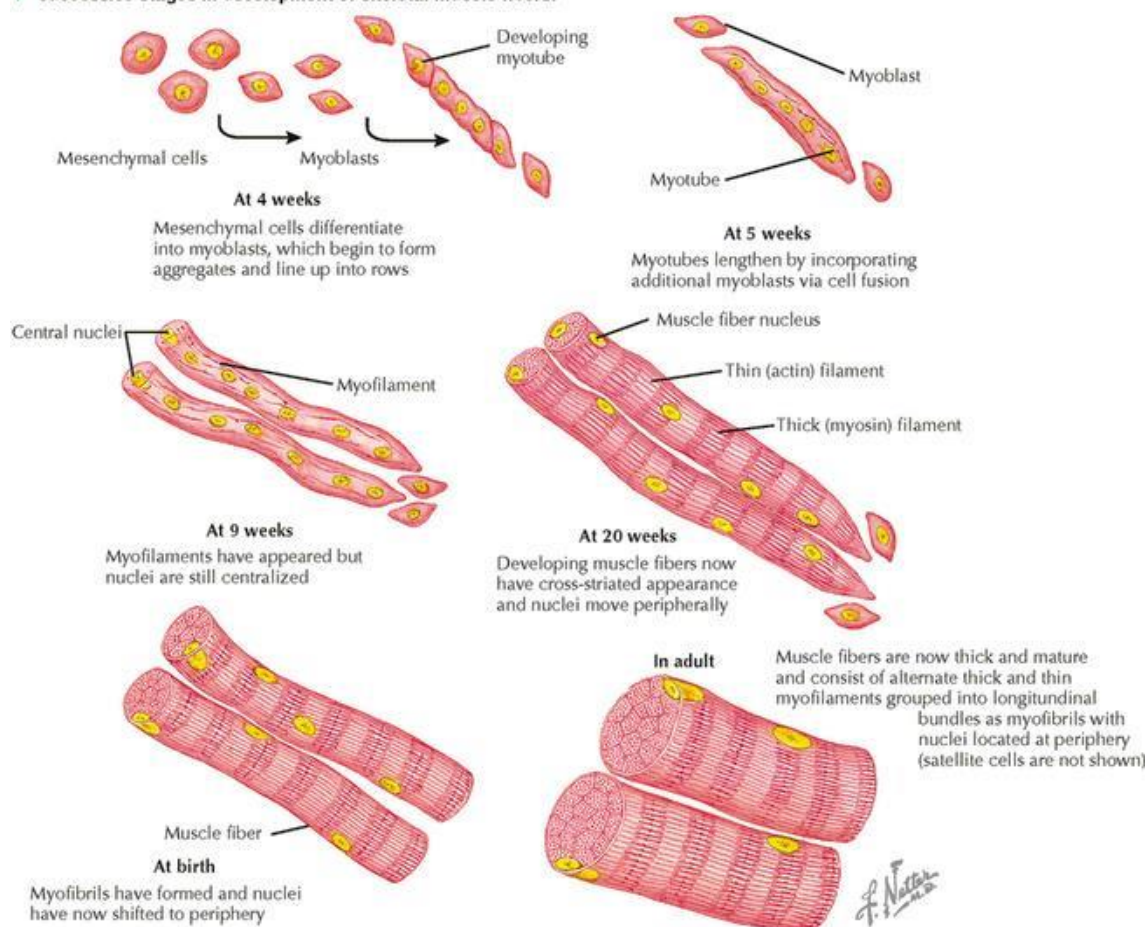


© 2012 Pearson Education, Inc.

ภาพ 5 การพัฒนาของกล้ามเนื้อลาย

ที่มา: <http://www.6aming.com>

▼ Successive stages in development of skeletal muscle fibers.



ภาพ 6 การเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อลาย

ที่มา: <https://basicmedicalkey.com/muscle-tissue-3/>

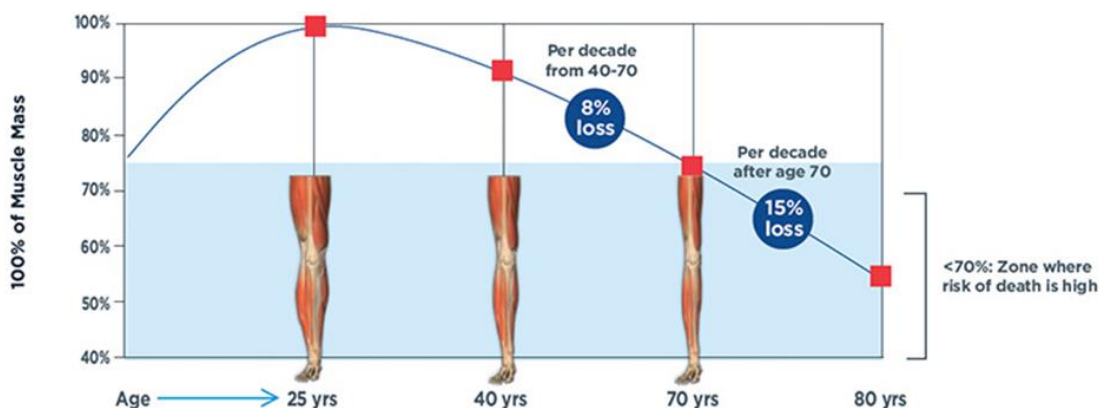
### 3. การสูญเสียมวลของกล้ามเนื้อ

การสูญเสียมวลของกล้ามเนื้อและมีความแข็งแรงของกล้ามเนื้อที่ลดลง ซึ่งภาวะนี้ถือเป็นกลุ่มอาการของผู้สูงอายุ (Geriatric Syndrome) ที่พบบ่อยถึง 1 ใน 3 ของผู้สูงอายุทั่วไป อาการของผู้สูงอายุที่มีมวลกล้ามเนื้อน้อยการมีลดลงของความแข็งแรงของ กล้ามเนื้อจึงถือว่าเป็นความผิดปกติของกล้ามเนื้อเริ่มแรกที่จะนำไปสู่การเกิดภาวะกล้ามเนื้อพร่องได้ เกณฑ์ที่ใช้ในการวินิจฉัยภาวะกล้ามเนื้อพร่องในเอเชียใช้เกณฑ์ของ Asian Working Group for Sarcopenia (AWGS) โดยลักษณะสำคัญทางคลินิกของภาวะกล้ามเนื้อพร่อง ได้แก่ การลดลงของมวลกล้ามเนื้อ (Low muscle mass) ร่วมกับการลดลงของความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ (Muscle Strangle) หรือการลดลงของ



สมรรถภาพกาย (Physical performance) ความผิดปกติของกล้ามเนื้อส่งผลกระทบต่อผู้สูงอายุในหลายด้าน ได้แก่ ลูกนั่งลำบาก ทรงตัวไม่ดี หกล้มบ่อย ๆ น้ำหนักลดลงโดยไม่ตั้งใจ เพิ่มความเสี่ยงของภาวะกระดูกหัก ภาวะเปราะบาง เหนื่อยง่ายจนจำกัดความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวัน คุณภาพชีวิตลดลง อาจเกิดโรคซึมเศร้า เพิ่มความเสี่ยงของการเสียชีวิตจากโรคแทรกซ้อนอื่น ๆ (Hirani V et al., 2015) เพราะความแข็งแรงและมวลกล้ามเนื้อฝ่อลงตามวัย ผู้สูงวัยหลายคนจึงประสบกับภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยที่อาจส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวันได้ โดยทั่วไปคนเราจะมีมวลกล้ามเนื้อสูงสุด (Peak Muscle Mass) ที่ช่วงอายุ 30-40 ปี หลังจากอายุ 40 ปี มวลกล้ามเนื้อก็จะเริ่มลดลงร้อยละ 1-2 ต่อปี ในช่วงแรกอาจจะยังไม่เห็นถึงความเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อหลังอายุ 50-60 ปี ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อก็จะลดลงด้วย และลดลงเร็วขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น จนเริ่มมีผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวันหลังอายุ 65 ปี

กล้ามเนื้อถือเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของร่างกาย (Preedy. et al, 2001) และการที่เกิดการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อนั้นมีความเกี่ยวข้องกับอายุ ดังภาพที่ 10 ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งของการเกิดความชราภาพที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ หลังจากอายุ 50 ปีไปแล้วจะเกิดการลดลงของมวลกล้ามเนื้อในอัตรา 1-2 % ต่อปี (Haeling. et al, 2010) การสูญเสียมวลกล้ามเนื้อและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพซึ่งอาจนำไปสู่การมีคุณภาพชีวิตที่ย่ำแย่ในเรื่องของการเคลื่อนไหวและการขยับร่างกายนอกจากนี้อาจนำไปสู่การเสียชีวิตได้ (Santilli. et al, 2014) ซึ่งสาเหตุของการเกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงมีหลายสาเหตุ เช่น ความบกพร่องในการทำงานของระบบประสาทสั่งการ (motor neuron) (Brown. et al, 1972), การลดลงของแอนนาบออลิกฮอร์โมน (anabolic hormones) เช่น growth hormone, testosterone และ estrogen (Gendersen. et al, 1998), ไมโทคอนเดรียในเซลล์กล้ามเนื้อสูญเสียการทำงาน (Matthew L. et al, 2012) รวมไปถึงการเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species: ROS) (Pansaras. et al, 1999) ซึ่งเมื่ออายุเพิ่มขึ้นจะเกิดการผลิต ROS เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เกิดการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งส่งผลเสียต่อการทำงานของกล้ามเนื้อ (Miquel J. et al, 1993 and Hunt. et al, 1998)



ภาพ 7 การลดลงของมวลกล้ามเนื้อเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น

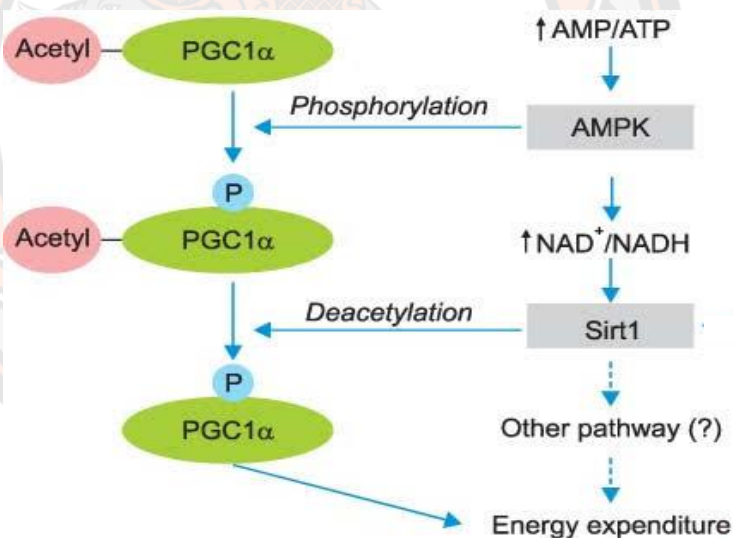
ที่มา: <http://fightsarcopenia.com/lbm-loss>

Mitochondria เป็นออร์แกเนลล์ที่จำเป็นซึ่งสร้างพลังงานส่วนใหญ่ที่ร่างกายมนุษย์ต้องการในรูปแบบของ adenosine triphosphate (ATP) นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียยังมีบทบาทในการควบคุม reactive oxygen species (ROS) และการควบคุมการส่งสัญญาณภายในเซลล์ การตายของเซลล์และกระบวนการเมตาบอลิซึม ไมโทคอนเดรียยังมี DNA (mtDNA) ของตัวเองซึ่งเข้ารหัสโปรตีนต่างๆ และเกี่ยวข้องกับห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนซึ่งเป็นเครื่องจักรที่สำคัญสำหรับการผลิต ATP ซึ่งเป็นกระบวนการประสานงานที่ซับซ้อนที่เกี่ยวข้องทรานสคริปชัน เป็นที่รับรู้ว่าเป็นโปรตีนที่สำคัญคือ PGC-1 $\alpha$  และ PGC-1 $\beta$

peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) เป็นตัวควบคุมหลักของ mitochondrial biogenesis นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน PGC-1 $\alpha$  เกิดจากการออกกำลังกายและการกระตุ้นทางเคมีของ AMPK ในกล้ามเนื้อโครงร่าง (Jäger et al., 2007) AMPK สามารถเพิ่มระดับของ NAD $^{+}$  ซึ่งส่งผลให้ SIRT1 กระตุ้น SIRT1 deacetylates PGC-1 $\alpha$  ดังนั้นจึงส่งเสริมการสร้าง mitochondrial biogenesis และในอีกทางของ PGC-1 $\alpha$  เกี่ยวข้องกับ MFN2 ในกลไกของการกระตุ้นการ mitochondrial biogenesis เกิดการรวมตัวกันของไมโทคอนเดรีย Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD $^{+}$ ) และ form (NADH) เป็นตัวควบคุมที่สำคัญของรีดอกซ์ภายในเซลล์ สภาวะสมดุลการเผาผลาญพลังงานและการส่งสัญญาณจำนวนมาก pathway NAD $^{+}$  สามารถสังเคราะห์สร้างขึ้นโดยการแปลงของ NADH โดยเอนไซม์เช่น NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) NAD $^{+}$  ยังทำหน้าที่เป็นร่วมกันในหลายด้าน NAD $^{+}$  ที่มีการนำไปใช้ เช่น sirtuins (SIRT1-7), poly (ADPribose) พอลิเมอเรส

(PARPs) และการสังเคราะห์ ADP-ribose แบบไซคลิก ซึ่งระดับเซลล์ NAD + จะมีการลดลงเมื่อมีโรคที่เกี่ยวข้อง, มีความผิดปกติของยีนหรือมีอายุเพิ่มมากขึ้น

SIRT1 ถือเป็นยีน "อายุยืน" ที่เกี่ยวข้องกับ deacetylation ของโปรตีนซึ่งเป็นลักษณะแรกที่สำคัญ ควบคุมช่วงชีวิตในสิ่งมีชีวิต และในยูคาริโอต (ลองโกและเคนเนดี, 2549) SIRT1 เกี่ยวข้องกับการยืดอายุขัยของเซลล์มนุษย์ (Michishita et al., 2005) เกี่ยวข้องกับ co-transcriptional / epigenetic และการเติบโตอย่างต่อเนื่อง รวมถึง PGC-1 $\alpha$  เป็นศูนย์กลางตัวควบคุม Mitochondrial biogenesis SIRT1 มีอิทธิพลต่อกระบวนการมากมายที่มีความสำคัญต่อการใช้ชีวิตของเซลล์ เช่นการ gene silencing หรือการกระตุ้น การตายของเซลล์, ความต้านทานต่อความเครียด, ความชรา, สมดุลพลังงานและไขมัน และการเผาผลาญกลูโคส ยีน Sirtuins เป็นยีนหลักในการควบคุมความแก่และป้องกันโรคภัย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง SIRT1 ดังนั้น จึงมุ่งเน้นที่จะกระตุ้นการทำงานของ SIRT1 โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า Resveratrol (ที่มีอยู่ในไวน์แดง) สามารถกระตุ้น Sirt1 มีการวิจัยเพิ่มเติมและค้นพบว่า NAD<sup>+</sup> มีความสำคัญในการควบคุมและกระตุ้น SIRT1 อีกทีหนึ่ง และ NAD<sup>+</sup> นั้น จะลดจำนวนลงเหลือครึ่งหนึ่งเมื่ออายุเพิ่มขึ้น



ภาพ 8 Path way การควบคุมและกระตุ้น Sirt1

ที่มา; <https://doi.org/10.4068/cmj.2010.46.2.67>

#### 4. *Arthrospira platensis*

สาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิส (*Arthrospira platensis*, *A. platensis*) หรือสาหร่ายเกลียวทอง เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) อยู่ในวงศ์ Oscillatoraceae และมีความสามารถในการสังเคราะห์แสง มีลักษณะเป็นเกลียว มีเซลล์หลายเซลล์ เป็นสาหร่ายขนาดเล็ก มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1 mm มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ดังภาพที่ 9 สาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิสเกิดขึ้นตามธรรมชาติในทะเลสาบเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนที่มีค่า pH สูงซึ่งมีค่าความเป็นด่างเท่ากับ 8.5-11.0 และมีความเข้มข้นของคาร์บอนและไบคาร์บอนสูง *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) พบในแอฟริกา เอเชียและอเมริกาใต้ ขณะที่ *Arthrospira maxima* (*Spirulina maxima*) จำกัดอยู่แต่เฉพาะในอเมริกา มีการใช้คาร์บอน และไนโตรเจนเป็นสารอาหารหลักในการเจริญเติบโตซึ่งแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้อาจมาจากคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) หรือจากโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO<sub>3</sub>) ซึ่งในปัจจุบันนิยมเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้สูตรอาหาร Zarrouk (Zarrouk, 1966)

ตาราง 1 องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย *S. platensis* และ *S. maxima*

สาหร่าย	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง (%)					
	น้ำ	เถ้า	ไขมัน	เส้นใย	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน
<i>S. platensis</i>	6-10	4-5	9-14	3-8	10-18	56-77
<i>S. maxima</i>	4-7	6-9	4	1	8-13	60-71

ที่มา: Ciferri et al., 1983

สาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิส ได้รับการรับรองจาก FDA (Food and Drug Administration) ว่าไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ และสามารถใช้เป็นอาหารเสริมในมนุษย์ได้อย่างถูกกฎหมาย ซึ่งสาหร่ายชนิดนี้มีมูลค่าทางการค้าขนาดใหญ่ เป็นแหล่งอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูง มีช่วงระหว่าง 50-70% ของน้ำหนักแห้ง (Kissoudi et al., 2018). มีกรดอะมิโนมากถึง 18 ชนิด ซึ่งโปรตีนมีปริมาณสูงกว่าเนื้อสัตว์ มีวิตามินที่มีคุณค่าต่าง ๆ มากมาย และยังอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอันโดดเด่นที่ช่วยในการส่งเสริมสุขภาพ ไม่ว่าจะเป็นกรดไขมัน  $\gamma$ -linolenic acid (GLA)

(Sajilata, M.G., Singhal et al, 2008), สาร Antioxidant  $\beta$ -carotene (Wang et al, 2007) และ PC (Kumar et al, 2014) นอกจากนี้ยังมีผนังเซลล์ที่นิ่ม อ่อนบาง จึงดูดซึมและย่อยง่ายกว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่น ๆ และยังได้รับการยอมรับในวงการแพทย์ว่ามีคุณค่าทางโภชนาการที่ดี เป็นแหล่งอาหารเพื่อสุขภาพ เพิ่มภูมิคุ้มกันและฟื้นฟูระบบการทำงานของร่างกายส่งเสริมให้สุขภาพดีขึ้น สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวจะถูกใช้แหล่งที่มาของโปรตีน, วิตามิน B และเหล็ก ยังใช้สำหรับการลดน้ำหนัก, โรคสมาธิสั้น-สมาธิสั้น (ADHD), เบาหวาน, ความเครียดความเหนื่อยล้าความวิตกกังวลซึมเศร้าและโรค premenstrual (PMS) เป็นต้น ยังใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และยังมีในรูปแบบเม็ด เกล็ด และผง การใช้ประโยชน์โดยมนุษย์ (Vonshak, 1997). สามารถทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (Ciferri, 1983).

สาหร่ายเกลียวทองเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางว่าเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในปัจจุบัน แต่มีความหลากหลายของการใช้งานที่เป็นไปได้อื่น ๆ สำหรับไซยาโนแบคทีเรียนี้ ตัวอย่างเช่น นำมาใช้ในทางการแพทย์สำหรับผู้ป่วยที่มีปัญหาในการเคี้ยวหรือกลืนอาหาร (Adiba et al., 2008). นอกจากนี้พบว่ามีแนวโน้มผลในการรักษาโรคมะเร็งบางชนิดโรคภูมิแพ้และโรคโลหิตจางเช่นเดียวกับตับเป็นพิษและโรคหลอดเลือด (Asghari et al., 2016). นอกจากนี้ยังเป็นอาหารสัตว์ที่ทำให้สัตว์มีสุขภาพดี



ภาพ 9 *Arthrospira platensis*

ที่มา; [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Arthrospira\\_platensis](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Arthrospira_platensis)

ตาราง 2 คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่าย *S. platensis* (ส่วนประกอบ 100 กรัมของ  
น้ำหนักแห้ง)

ส่วนประกอบ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง)

Component	Value	Level
Moisture content	6-7	g
Protein	60-70	g
Fatty acid	4-5	g
Carbohydrate	15-18	g
Chlorophyll	1-2	g
Mixed carotenoid	350-450	mg
Beta carotene	180-190	mg
Phycocyanin	8-12	mg
GLA	1-2	mg
Calcium	400-600	mg
Iron	50-100	mg
Potassium	200-2000	mg
Magnesium	200-300	mg
Zinc	1.0-2.0	mg
Vitamin A1	100-200	mg

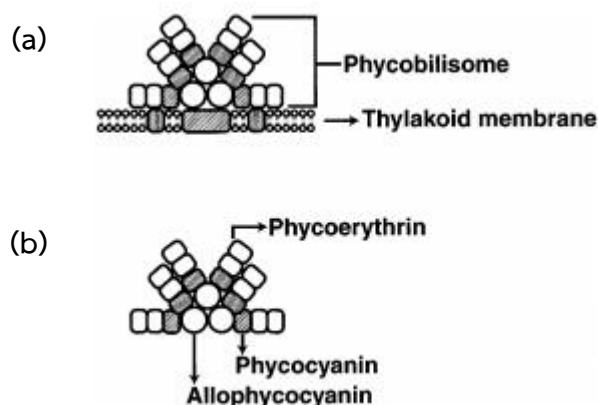


Vitamin B1	1.5-4.0	mg
Vitamin B2	3.0-5.0	mg
Vitamin B6	0.5-0.7	mg
Vitamin B12	0.05-2.0	mg
Vitamin E	5.0-20	mg

ที่มา: Choopani et al., 2016

## 5. Phycocyanin

Phycobiliproteins มีคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสง และยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยากับ reactive oxygen species ต่อต้านออกซิเจนได้ (ROS) เนื่องจากโครงสร้างทางเคมี และคุณสมบัติของคีเลตซึ่งช่วยลดความเครียดออกซิเดชัน (Roy et al., 2007; Rodriguez-Sanchez et al., 2012) โดยพบมากที่สุดคือไฟโคไบลิโพรตีน (Phycobiliproteins) โดยมีปริมาณมากถึง 14-16% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งประกอบไปด้วย 3 ชนิดที่มีความแตกต่างกันด้านสมบัติของสเปกตรัมการดูดกลืนคลื่นแสง C-phycoyanin (C-PC: 610-620 nm), phycoerythrin (PE: 540-570 nm), และ allophycocyanin (APC: 650-655 นาโนเมตร) (Lee et al., 2017) ทำให้เกิดสีของรงควัตถุ โดยอัลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin: APC) มีสีฟ้าอมเขียว ไฟโคอิริทริน (Phycoerythrin: PE) มีรงควัตถุสีแดง และซีไฟโคไซยานิน (C-Phycocyanin: CPC) ให้รงควัตถุสีฟ้า ซึ่งมีคุณสมบัติเรืองแสงได้ ละลายได้ดีในน้ำ และมีมูลค่าสูง ซึ่งปัจจุบันถูกนำมาประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์อย่างแพร่หลาย (Kamble et al., 2013) โดยการจัดเรียงตัวของไฟโคไบลิโพรตีนทั้ง 3 ชนิด บนโครงสร้างไฟโคไบลิโชมมีลักษณะดังภาพ 8 ซึ่งสำหรับสาหร่าย *A. platensis* พบเฉพาะไฟโคไซยานิน และอัลโลไฟโคไซยานิน (Padyana et al., 2001)



ภาพ 10 แบบจำลองการจัดเรียงตัวของไฟโคบิลิโซม (a) แสดงการเชื่อมต่อระหว่างไฟโคบิลิโซมกับเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ และ (b) แสดงตำแหน่งการจัดเรียงตัวของ 3 องค์ประกอบหลักในไฟโคบิลิโซม

ที่มา; Padyana et al., 2001

ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin : PC) เป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่มีรงควัตถุ (Chromophore) เกาะอยู่บนโมเลกุล ซึ่งสามารถสกัดได้จาก Cyanobacteria เช่น *Spirulina platensis* ซึ่งถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ในด้านผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับอาหาร และเครื่องสำอาง โดยไฟโคไซยานินเป็นสารที่มีสีฟ้าธรรมชาติ ซึ่งในปัจจุบันถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย ยกตัวอย่างเช่น ด้านการแพทย์ โดยนำมาประยุกต์ใช้ในการออกฤทธิ์ต่อการสมานแผล การป้องกันโรคตับจากพิษ ป้องกันผิวหนังจาก Oxidative stress และการป้องกันเซลล์ประสาทจากภาวะสมองขาดเลือด เป็นต้น เนื่องจากคุณสมบัติในการเรืองแสง (Fluorescence properties) จึงถูกนำมาใช้งานในด้านการวินิจฉัยโรคด้วยโมเลกุล และผลิตเป็นยารักษาโรคอีกหลายชนิด (Kissoudi et al., 2017) รวมถึงยังมีการพัฒนาไปเป็นอุตสาหกรรมประเภทอาหารเสริม อาหารบำรุงร่างกาย ชนิดต่าง ๆ และยังมีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตอาหารมนุษย์ และสัตว์อีกด้วย Phycocyanins มีมวลโมเลกุล 140-210 kDa การดูดกลืนแสงสูงสุดสำหรับ C-PC อยู่ระหว่าง 610 ถึง 620 นาโนเมตรและ C-PC มักมีสีน้ำเงินโคบอลต์สีเข้ม C-PC ใช้ไม่เพียง แต่เป็นส่วนผสมอาหารและสีย้อมตามธรรมชาติสำหรับอาหารและเครื่องสำอาง (Rossano et al., 2003; Roman et al., 2002) แต่ยังใช้ในการวินิจฉัยการวิจัยทางชีวการแพทย์และการบำบัดโรคเป็นไปได้ ความบริสุทธิ์ของ C-PC โดยทั่วไปมีการประเมินโดยใช้อัตราส่วนการดูดกลืนแสงของ A 620 / A280



ในปัจจุบัน Phycocyanin มีมูลค่าทางการค้าสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากกระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์มีต้นทุนสูง ราคาของ C-PC อยู่ที่ประมาณ 10-50 เหรียญสหรัฐต่อมิลลิกรัม และราคาเกรดอาหาร C-PC อยู่ที่ประมาณ 1-5 เหรียญสหรัฐต่อกรัม (Kuddus et al., 2012 and Kannaujiya et al., 2016) ซึ่งความบริสุทธิ์ในช่วง 0.7 ถือว่าเป็นเกรดอาหาร ช่วง 3.9 เป็นเกรดห้องปฏิบัติการ และมากกว่า 4.0 เป็นเกรดวิเคราะห์ สำหรับการพัฒนาสำหรับการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของ C-PC สามารถทำได้ด้วยวิธีการหลายวิธีการ เช่น การหัตถ์ของความหนาแน่น การตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต วิธีโครมาโตกราฟี และการสกัดแบบสองขั้นตอนในน้ำ



ภาพ 11 Phycocyanin

ที่มา; <https://henchbiotech.en.made-in-china.com/>

## 6. 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 ไม่จำเป็นต้องอยู่ในรูป

ของ free radical เสมอ (Lockwood. et al, 2007) ROS ถือเป็นสารอันตรายที่มีต้นเหตุมาจากปัจจัยภายนอก เช่น รังสี UV หรือสารพิษต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย และปัจจัยภายในซึ่งก็คือ ความผิดปกติของกิจกรรมภายในเซลล์ โดยในกรณีของเซลล์กล้ามเนื้อ ROS เริ่มต้นจากการทำงานผิดปกติของ ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) หรือแหล่งกำเนิดพลังงานภายในเซลล์ทำให้เกิด Superoxide หนึ่งใน ROS ซึ่งหากไม่ได้รับการควบคุม ก็จะส่งผลกระทบต่อ ROS ตัวอื่น ๆ ต่อไป (Steinbacher & Eckl, 2015) การสะสมของ ROS ในระดับต่ำมีผลดีก็คือ ช่วยกระตุ้นการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อ แต่หากร่างกายออกกำลังอย่างหนักและเป็นเวลานานจะทำให้ระดับ ROS เพิ่มขึ้นกว่าจุดที่ร่างกายจะควบคุมได้ (Clanton et al., 1999; Powers & Jackson, 2008; Supinski, 1998) นอกจากนี้ ROS สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาถูกโซ่จนเกิดเป็นผลกระทบต่อเนื้อเยื่อไม่ว่าจะเป็น Lipid peroxidation, Protein Oxidation หรือ DNA oxidation (Kondo et al., 1994) และยิ่งไปกว่านั้น ROS ยังเป็นต้นเหตุให้เกิดการสลายของกล้ามเนื้อผ่านการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน อย่างเช่น Calpain และเอนไซม์ Caspase-3 ซึ่งมีส่วนสำคัญในกระบวนการตายของเซลล์ (Apoptosis) (Du et al, 2004; Powers et al, 2007)

ROS เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แหล่งที่แตกต่างกันดังนี้

1. ปัจจัยภายในร่างกาย (Endogenous Sources) ROS จะเกิดขึ้นจากกระบวนการต่าง ๆ 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 โดยสิ่งเร้าต่าง ๆ จะมีการสร้าง  $O_2^{\cdot -}$  ขึ้นผ่านทาง NADPH oxidase โมเลกุล  $O_2^{\cdot -}$  ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนต่อไปเป็น  $H_2O_2$  และเกิดเป็น hypochlorite (HOCl) ในที่สุด (Nimse. and Pal., 2015)

2. ปัจจัยภายนอกในร่างกาย (Exogenous Sources) ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมมีส่วนอย่างมากในการกระตุ้นให้เกิด ROS โดยเฉพาะอย่างยิ่งรังสีต่าง ๆ เช่น UV, X-ray, Gamma ray โดยรังสีเหล่านี้จะกระตุ้นให้น้ำเปลี่ยนไปเป็น hydroxyl radical หรือแม้แต่มลภาวะทางเคมีเช่น paraquat จะกระตุ้นให้เกิด peroxide หรือ ozone สารพวก quinones และ nitroaromatics ก็ทำให้เกิด superoxide ได้ (Nimse & Pal, 2015)

ตาราง 3 ตัวอย่างของ RS โดยแบ่งประเภทตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation และแบ่งย่อยโดยลักษณะของการ เป็น radical ของโมเลกุล

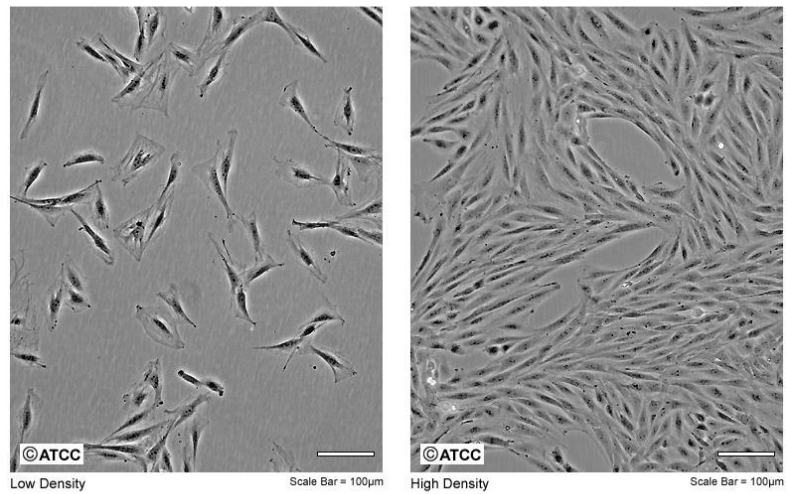
Type of RS	Free radicals	Formula	Non-radicals	Formula
ROS	Oxygen radical	$O_2^{\cdot}$	Singlet oxygen	$O_2^{\cdot}$
	Superoxide radical	$O_2^{\cdot -}$	Hydrogen peroxide	$H_2O_2$
	Hydroxyl radical	$OH^{\cdot}$	Ozone	$O_3$
	Hydroperoxyl radical	$HO_2^{\cdot}$		
	Peroxyl radical	$RO_2^{\cdot}$		
	Alkoxyl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

ที่มา: Lockwood B. et al, 2007

## 7. L6 skeletal muscle cell

L6 skeletal muscle cell ที่ใช้ในการทดลองได้มาจากหนูสายพันธุ์ *Rattus norvegicus* เป็นเนื้อเยื่อชนิดกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle) ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์ชนิด myoblast ดังภาพที่ 12 โดยในการเพาะเลี้ยงจะทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงให้เป็น myotube ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยและมีนิวเคลียสหลายนิวเคลียส ดังภาพที่ 13 และได้รับการรองรับความปลอดภัยทางชีวภาพตามหลักเกณฑ์ของ U.S. Public Health Service Guidelines

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



ภาพ 12 L6 myoblast cell

ที่มา: <https://www.atcc.org>



ภาพ 13 การ differentiation จากเซลล์ L6 myoblast cell เป็น myotube cell

ที่มา: <http://dev.biologists.org>

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 1. การเลี้ยงเซลล์สาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิส

อาหารเลี้ยงเซลล์สาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิส ในขวดขนาด 1 L โดยใช้สูตรอาหาร Zarrouk's media ดังตารางที่ 4

ตาราง 4 องค์ประกอบในสูตรอาหาร Zarrouk's medium

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

หมายเหตุ สารละลาย A5 (2.86 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.80 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.22 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.08 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O and 0.018 g MoO<sub>3</sub>)

สารละลาย B6 (0.023 g NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>, 0.048 g NiSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.018 g Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O and 0.044 g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)

โดยเลี้ยงในอาหารสูตร Zarrouk ที่ไม่มี NaHCO<sub>3</sub> ซึ่งคำนวณความเข้มข้นเริ่มต้นของสาหร่ายด้วยการวัดดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (OD560) โดยให้มีค่าความหนาแน่นของเซลล์ (Optical density: OD) เริ่มต้น 0.3±0.50 โดยการคำนวณหาน้ำหนักแห้ง (Dry biomass; g/l) [Biomass (g/L) = OD560 nm - 0.0527/1.4531] เมื่อครบกำหนด ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายใช้



ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) ด้วยกระดาศกรงที่มีรูขนาด 37 ไมโครเมตรเพื่อเก็บเซลล์นำไปสกัดขั้นต่อไป

## 2. การสกัดสารจากสาหร่ายอาร์โธรสไปรา พลาเทินซิส

### 2.1 การแตกเซลล์ด้วยการแช่เยือกแข็งละลาย (Freeze thaw)

ตัวอย่างเซลล์สาหร่ายในอาหารสูตร Zarrouk's media ที่ไม่มี  $\text{NaHCO}_3$  นำมากรองโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) และบ่มไว้ในน้ำกลั่นเย็นในสภาวะไร้แสง โดยนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้องนาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย ด้วยความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนสารละลาย และตะกอนสาหร่าย นำส่วนสารละลาย (Supernatant) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer โดยวัดที่ความยาวคลื่น 280, 465, 620, 652 และ 665 nm จากนั้นคำนวณปริมาณ Phycocyanin ทั้งหมด โดยใช้สูตร (Patel et al., 2005) ด้วยสมการ

$$\text{ปริมาณ Phycocyanin (mg/ml)} = [A_{620} - 0.474 (A_{652})] / 5.34$$

$$\text{ความบริสุทธิ์} = A_{620} / A_{280}$$

### 2.2 การแตกเซลล์ด้วยการแช่เยือกแข็งละลาย (Freeze thaw) และการตกตะกอนด้วย Ammonium sulphate

โดยนำส่วนของเหลวสีฟ้าที่ได้จากขั้นตอน 2.1 ที่ได้จากการสกัดด้วยการแช่เยือกแข็งละลายเติม 10% Ammonium sulphate จากนั้นนำสารละลายที่ได้เก็บไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนตะกอนคลอโรฟิลล์ออกส่วนของเหลวที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ DEAD-Sephadex G-25 โดย คอลัมน์จะถูกปรับสมดุลก่อนด้วยบัฟเฟอร์ Sodium phosphate buffer 0.005 mM (pH 7) และล้างด้วยบัฟเฟอร์เดียว จากนั้นนำส่วนสารละลายที่ได้หลังผ่านคอลัมน์ เติม 50% Ammonium sulphate (%Saturation) จากนั้นนำสารละลายที่ได้เก็บไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการแยกส่วนสารละลาย และตะกอน นำส่วนตะกอนที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAD-Sephadex G-25 ส่วนของเหลวตะกอนที่ได้ ไปผ่านคอลัมน์ DEAD-Sephadex G-25 คอลัมน์ ถูกปรับสมดุลก่อนด้วยบัฟเฟอร์ Sodium phosphate buffer 0.005 M (pH 7) และล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดียวกันที่อัตราการไหล (อัตราการไหล 2 ml/นาที)

นำส่วนสารละลาย (Supernatant) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer โดยวัดที่ความยาวคลื่น 280, 465, 620, 652 และ 665 nm

### 2.3 นำมาสกัดโดยใช้โซนิเคเตอร์

ตัวอย่างเซลล์สหายในอาหารสูตร Zarrouk's media ที่ไม่มี  $\text{NaHCO}_3$  นำมากรองโดยใช้ขี้มสุญญากาศนำเซลล์สหายทำการแตกเซลล์โดยใช้โซนิเคเตอร์บนน้ำแข็ง ที่แอมพลิจูด 60%, 5s/5s pulse 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย ด้วยความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนสารละลาย และตะกอนสหาย นำส่วนสารละลาย (Supernatant) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer โดยวัดที่ความยาวคลื่น 280, 465, 620, 652 และ 665 nm จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ทำการ Freeze dry ให้ได้เป็นสารสกัดเป็นผงที่แห้งเพื่อนำไปใช้ต่อไป

### 3. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี DPPH Assay

DPPH Assay วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล (methanol) สารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ดำเนินการทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบ DPPH assay ในระดับหลอดทดลองของสารสกัดจากสหายอาร์โธรสไปรา พลาเทินซิส ทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100, 500, 1,000, 1,500, 2,000  $\mu\text{g/ml}$  โดยเริ่มจาก reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล (methanol) สารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Seo, Y. et al., 2013). โดยใช้อัตราส่วนสารละลาย DPPH 190  $\mu\text{l}$  ต่อ 10  $\mu\text{l}$  ตัวอย่าง ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีแล้วทำการวัดที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (OD517)

$$\% \text{Radical Scavenging} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

เมื่อ AA = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

AB = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

### 4. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการอยู่รอดและความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหนู L6 ทำการ seed cell 1000 cell/well 96 well plate ในอาหาร 10% FBS complete media (1X DMEM, 10% FBS, 1% Antibiotic) โดยเลี้ยงในสภาวะ

ที่เหมาะสม (5% CO<sub>2</sub>, อุณหภูมิ 37 °C) จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตและมี %Confluent ประมาณ 60-80% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อ L6 differentiate เป็นเซลล์กล้ามเนื้อโดยทำการเปลี่ยนอาหาร การลดปริมาณอาหารจาก 10% FBS complete media เป็น 2% ทำการ differentiation โดยใช้ complete media ที่มี 2% FBS เพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อ L6 differentiate เป็นเซลล์กล้ามเนื้อ เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์กล้ามเนื้อและมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 90-100% จะทำการ treat สารสกัด 3 แบบ สารสกัดที่ได้จากวิธีโซนิเคชัน (SC), สารสกัดที่ได้จากการแช่เยือกแข็งละลาย Freeze thaw (FT) และตกตะกอนด้วย Ammonium sulphate ทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAD-Sephadex G-25 (ASE) ทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250 และ 1500 ug/ml ดูอัตราการรอดชีวิตและความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Crystal violet assay เมื่อทำการ treat สารครบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Crystal violet assay โดยการนำอาหารและสารที่เติมลงไปออกและล้างเซลล์ด้วย PBS buffer และทำการเติมสาร Crystal violet 0.5% w/v 50 ul/well ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที และทำการล้างด้วยวิธี Crystal violet assay ออกด้วยการ rinse นำประปา เพื่อล้างสี Crystal violet ส่วนที่ไม่ติดกับเซลล์ออกและทำให้แห้งโดยซับน้ำออก จากนั้นทำการเติม 100% DMSO 200 ul/well เป็นตัวทำละลาย Crystal violet ที่ย้อมติดเซลล์ และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร

##### 5. ทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี DCHF Da Assay

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อ L6 ทำการ seed cell 1000 cell/well 96 well plate การ treat สารสกัดทั้ง 3 แบบ ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250 และ 1500 ug/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มด้วย 2 uM CM-H2DCFDA เป็นเวลา 30 นาทีที่ 37°C หลังจากการแพร่กระจายไปยังเซลล์ DCFH-DA จะถูก deacetylated โดย esterase ของเซลล์ไปยังสารประกอบที่ไม่ใช่ฟลูออเรสเซนต์ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์โดย ROS เป็น 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) DCF เป็นสารประกอบที่มีฟลูออเรสเซนต์สูงซึ่งสามารถตรวจจับได้ด้วยการตรวจด้วยแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ 495 nm / 529 nm

##### 6. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟื้นฟูเซลล์หลังจากการเกิด oxidative stress ในเซลล์กล้ามเนื้อ (%Recovery)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อ L6 ทำการ seed cell 1000 cell/well 96 well plate ในอาหาร 10%FBS complete media จากนั้นเพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อ L6 differentiate เป็นเซลล์กล้ามเนื้อโดยทำการเปลี่ยนอาหาร การลดปริมาณอาหารจาก 10% FBS complete media เป็น 2% FBS complete media เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์กล้ามเนื้อและมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 90-100% จะทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ เติม 2% FBS complete media



100 ul/well และเติม  $H_2O_2$  1 mM 100 ul/well เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการ นำอาหารและ  $H_2O_2$  ออก และล้างล้างเซลล์ด้วย PBS buffer จากนั้นทำการเติม 2% FBS complete media และ treat สารสกัดทั้ง 3 แบบ สารสกัดที่ได้จากวิธีโซนิเคชัน (SC), สารสกัดที่ได้จากการแช่เยือกแข็งละลาย Freeze thaw (FT) และตกตะกอนด้วย Ammonium sulphate ทำ บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAD-Sephadex G-25 (ASE) ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250 และ 1500 ug/ml ดูอัตราการรอดชีวิตและความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย วิธี Crystal violet assay เมื่อทำการ treat สารครบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการย้อมเซลล์ด้วย วิธี Crystal violet assay โดยการนำอาหารและสารที่เติมลงไปออกและล้างเซลล์ด้วย PBS buffer และทำการเติมสาร Crystal violet 50 ul/well ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที และทำการล้างด้วยวิธี Crystal violet assay ออกด้วยการล้างด้วยน้ำประปา เพื่อล้างสี Crystal violet ส่วนที่ไม่ติดกับ เซลล์ออกและทำให้แห้งโดยซับน้ำออก หลังจากนั้นทำการเติม 100% DMSO 200 ul/well เป็นตัว ทำละลาย Crystal violet ที่ย้อมติดเซลล์ และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร

#### 7. ศึกษารูปร่างของเซลล์จากการได้รับสารสกัดต่อการฟื้นฟูเซลล์หลังจากการเกิด oxidative stress ในเซลล์กล้ามเนื้อ

ทำการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Crystal violet assay โดยการนำอาหารและสารที่เติมลงไปออก และล้างเซลล์ด้วย PBS buffer และทำการเติมสาร Crystal violet 50 ul/well ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที และทำการล้างด้วยวิธี Crystal violet assay ออกด้วยการล้างน้ำประปา เพื่อล้างสี Crystal violet ส่วนที่ไม่ติดกับเซลล์ออกและทำให้แห้งโดยซับน้ำออกและทำการศึกษารูปร่างของเซลล์ กล้ามเนื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ความขยาย 4x, 10x และ 40x เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับ Control

#### 8. การวัดปริมาณโปรตีน SIRT 1 โดย SIRT 1 Assay kit

SIRT1 Activity Assay Kit วัดปริมาณการทำงานของโปรตีน SIRT 1 (Seo. et al., 2018). ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อ L6 ทำการ seed cell 10000 cell/well 6 well plate ในอาหาร 10% FBS complete media จากนั้นเพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อ L6 differentiate เป็นเซลล์ กล้ามเนื้อโดยทำการเปลี่ยนอาหาร การลดปริมาณอาหารจาก 10% FBS complete media เป็น 2% FBS complete media เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์กล้ามเนื้อและมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 90-100% จะทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ เติม 2% FBS complete media 100 ul/well และเติม  $H_2O_2$  1 mM 100 ul/well เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำ การนำอาหารและ  $H_2O_2$  ออก และล้างล้างเซลล์ด้วย PBS buffer จากนั้นทำการเติม 2% FBS complete media และ treat สารสกัดทั้ง 3 แบบ สารสกัดที่ได้จากการแช่เยือกแข็งละลาย Freeze thaw (FT) และสารสกัดที่ได้จากวิธีโซนิเคชัน (SC) ที่ความเข้มข้น 0, 75, 100, 150, 250 และ 500 ug/ml ในการเก็บเซลล์โดยใช้สาร trypsin trypsinite cell และขูดเซลล์ออกจากเพลตด้วย

scraper และล้างเซลล์ด้วย PBS เย็น เก็บบนน้ำแข็ง และนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาทีที่ 4 ° C ล้างเป็นจำนวน 2 รอบ และจากนั้นทำการเติม RIPA buffer 100 ไปเปิดให้เซลล์แตก และ vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาทีที่ 4 ° C และ Supernatant ที่เป็นเซลล์ lysate ที่ -20° C ก่อนทำการทดสอบทำการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford assay จากนั้นเติม reaction mixture ที่มี Fluoro-Substrate peptide solution และวัด Deacetylase ขึ้นอยู่กับ การทำงานของ NAD เป็นการทดสอบปริมาณการทำงานของ SIRT1 และทำการเทียบกับสาร recombinant SIRT1 เป็น positive control

### 9. การวัดปริมาณ ATP โดย ATP Assay kit

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อ L6 ทำการ seed cell 10000 cell/well 6 well plate ในอาหาร 10% FBS complete media จากนั้นเพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อ L6 differentiate เป็นเซลล์กล้ามเนื้อโดยทำการเปลี่ยนอาหาร การลดปริมาณอาหารจาก 10% FBS complete media เป็น 2% FBS complete media เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์กล้ามเนื้อและมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 90-100% จะทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ เติม 2% FBS complete media 100 ul/well และเติม H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM 1000 ul/well เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการนำอาหารและ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ออก และล้างล้างเซลล์ด้วย PBS buffer จากนั้นทำการเติม 2% FBS complete media และ treat สารสกัดทั้ง 3 แบบ สารสกัดที่ได้จากการแช่เยือกแข็งละลาย Freeze thaw (FT) และสารสกัดที่ได้จากวิธีโซนิเคชัน (SC) ที่ความเข้มข้น 0, 75, 100, 150, 250 และ 500 ug/ml ในการเก็บเซลล์โดยใช้สาร trypsin trypsinite cell และขูดเซลล์ออกจากเพลตด้วย scraper และนำไปนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemacytometer เริ่มจำนวนเซลล์ที่เท่ากันที่ 100,000 เซลล์ และนำเซลล์ที่ได้จากการนับ 100,000 เซลล์ล้างเซลล์ด้วย PBS เย็น เก็บบนน้ำแข็ง และนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาทีที่ 4 ° C ล้างเป็นจำนวน 2 รอบ และจากนั้นทำการเติม RIPA buffer 100 ไปเปิดให้เซลล์แตก และ vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาทีที่ 4 ° C และ Supernatant ที่เป็นเซลล์ lysate ที่ -20° C และทำการวัดด้วย ATP Assay kit

### 10. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองทั้งหมดทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±S.D) จากนั้นนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p < 0.05)

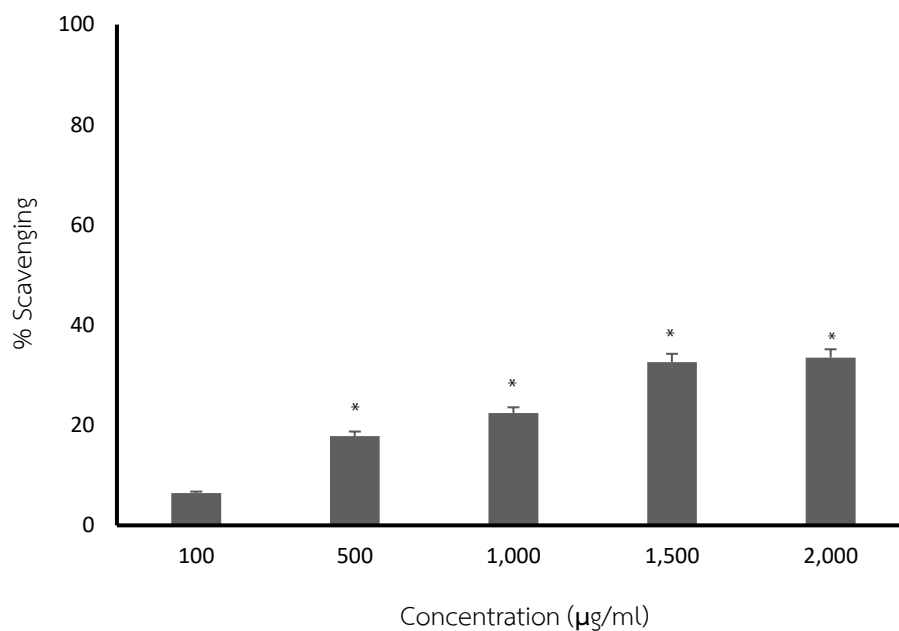
## บทที่ 4 ผลการวิจัย

ตาราง 5 ผลผลิตสารสกัดที่ได้อ้อยละของน้ำหนักแห้ง (%)

Extracts	Phycocyanin (mg/ <i>A.platensis</i> 100 mg)	Purity (620/280)	%yield
SC	2.53±1.5	0.90	91.73±5.1
FT	3.28±1.1	1.04	95.90±4.2
ASE	2.15±0.7	2.35	44.17±3.5

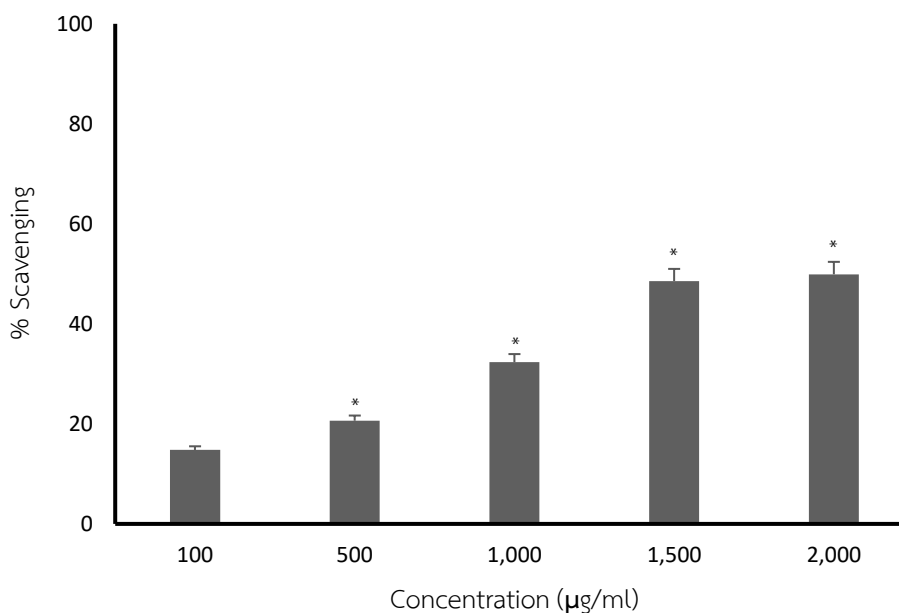
### ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิสโดยวิธี DPPH assay

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ สารสกัด SC, สารสกัด FT และสารสกัด ASE ด้วยการทดสอบ DPPH Assay พบว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (scavenging) เท่ากับ  $33.4 \pm 0.019\%$ ,  $49.9 \pm 2.775\%$ , และ  $11.9 \pm 0.005\%$  ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2,000  $\mu\text{g/ml}$  จากข้อมูลที่ได้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัด FT มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระได้สูงสุด ขณะที่สารสกัด ASE มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระได้ต่ำสุด



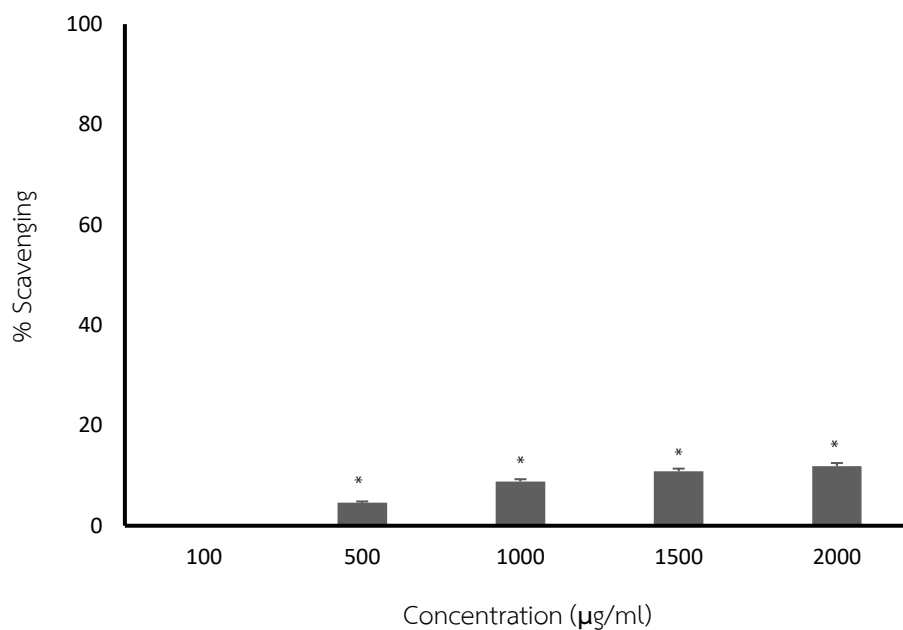
ภาพ 14 เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) ด้วยการทดสอบ DPPH assay ของสารสกัด SC ความเข้มข้น 100, 500, 1,000, 1,500, 2,000 µg/ml

หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 100 µg/ml



ภาพ 15 เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) ด้วยการทดสอบ DPPH assay ของสารสกัด FT ความเข้มข้น 100, 500, 1,000, 1,500, 2,000 µg/ml

หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$

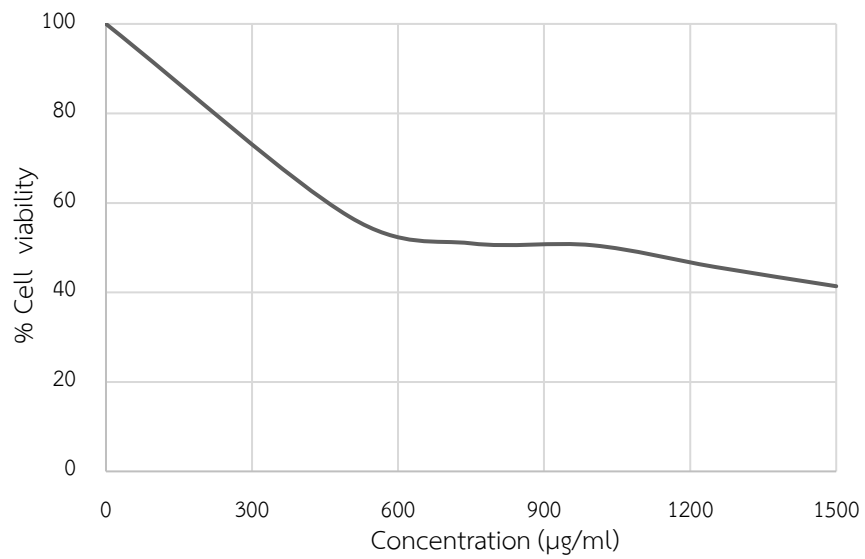


ภาพ 16 เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) ด้วยการทดสอบ DPPH assay ของสารสกัด ASE ความเข้มข้น 100, 500, 1,000, 1,500, 2,000  $\mu\text{g/ml}$

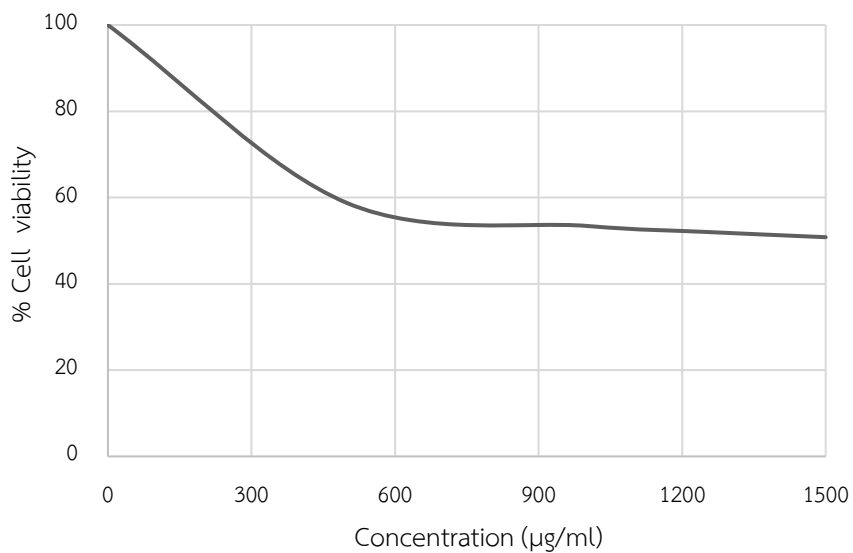
หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$

#### การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดอาร์โธรสไปรา ฟลาเทินซิสในเซลล์กล้ามเนื้อหนู

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนูของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดด้วยวิธี crystal violet assay พบว่า ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัด SC, สารสกัด FT และสารสกัด ASE ที่ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหนูมีอัตราการรอด 50% (LD50) เท่ากับ 750  $\mu\text{g/ml}$ , 1,400  $\mu\text{g/ml}$  และ 800  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัด FT มีความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนูน้อยที่สุด ขณะที่สารสกัด SC มีความเป็นพิษสูงสุด

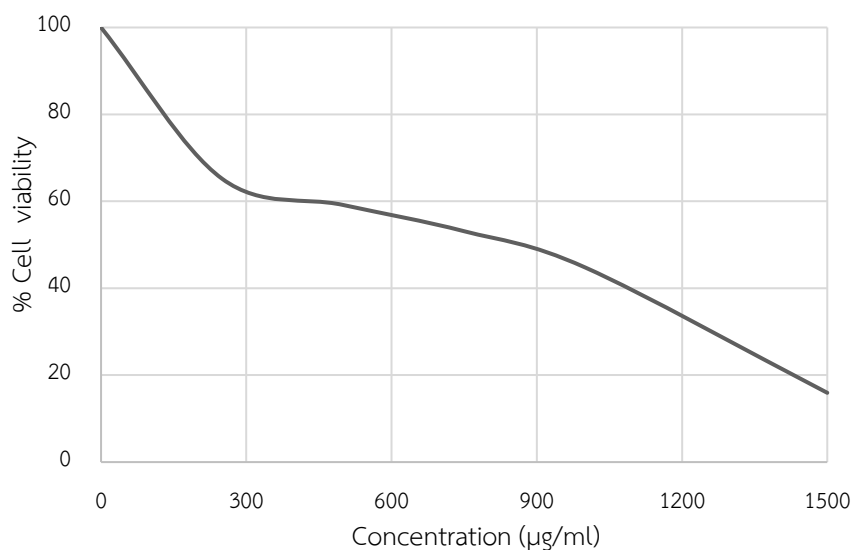


ภาพ 17 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อในสารสกัด SC ความเข้มข้น 0 – 1,500 µg/ml



ภาพ 18 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อในสารสกัด FT ความเข้มข้น 0 -1,500 µg/ml

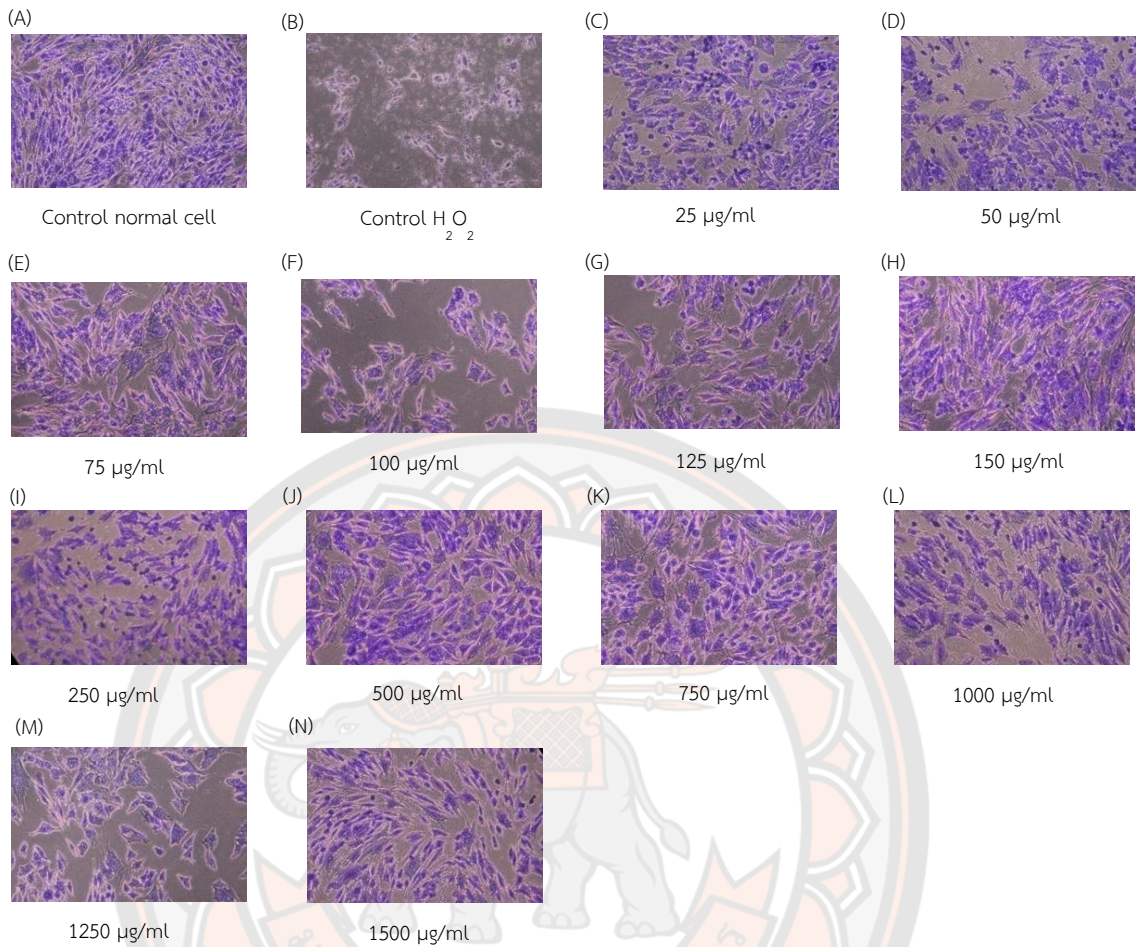




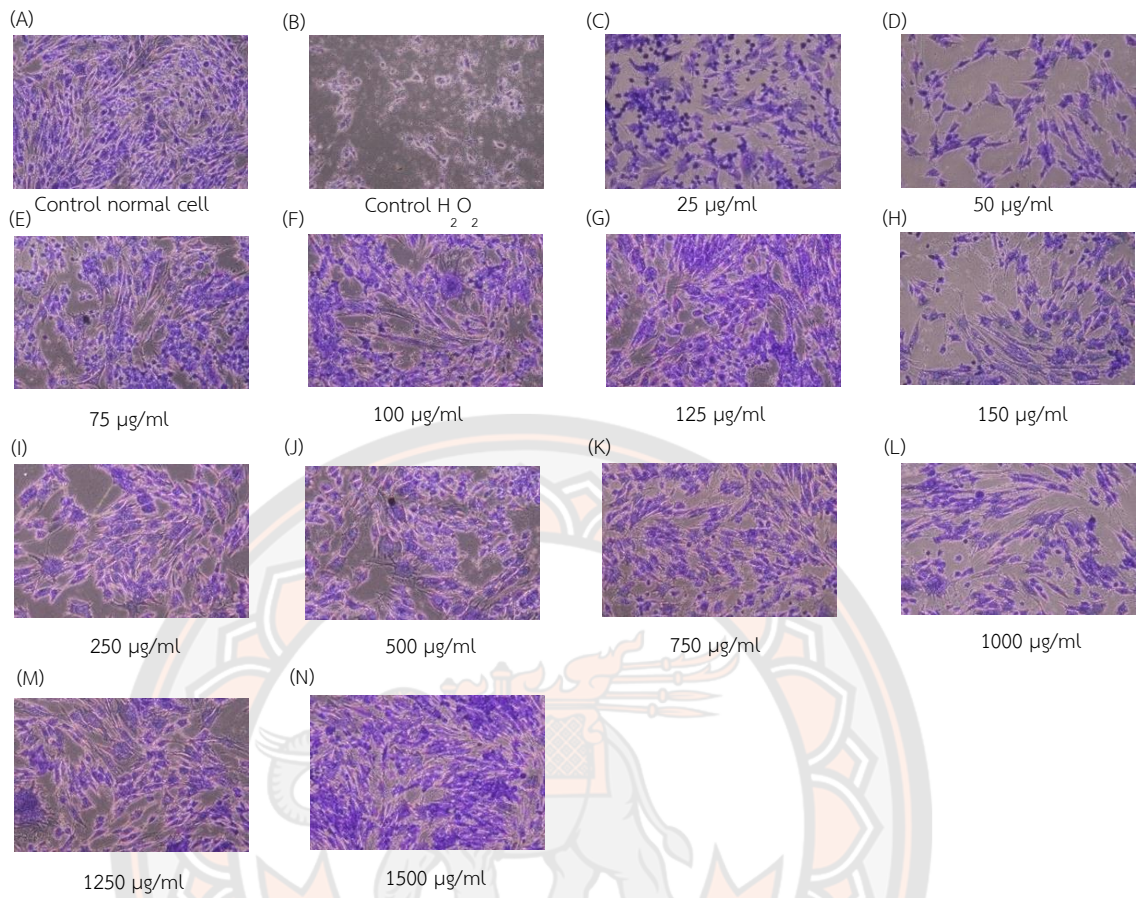
ภาพ 19 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อในสารสกัด ASE ความเข้มข้น 0 -1,500 µg/ml

### การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสำหรับไวรัสไปร่า พลาแทนซิสต่อการฟื้นฟูกล้ามเนื้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน

หลังจากเหนี่ยวนำเซลล์กล้ามเนื้อให้เกิดความเครียดออกซิเดชันด้วย  $H_2O_2$  แล้วจึงทำการผสมสารสกัดทั้ง 3 ชนิดและทำการย้อมเซลล์ด้วย crystal violet assay เพื่อศึกษาการฟื้นฟูเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเซลล์กล้ามเนื้อหดสั้นลงกว่าเดิมจนมีรูปร่างกลม และเมื่อผสมสารสกัดลงไปที่มีความเข้มข้นต่างกัน จะสังเกตเห็นการฟื้นตัวของเซลล์กล้ามเนื้อภายใน 24 hr เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน โดยความเข้มข้นของสารสกัด SC, สารสกัด FT และสารสกัด ASE ที่สามารถฟื้นฟูเซลล์ให้กลับมา มีรูปร่างเหมือนปกติเท่ากับ 150 µg/ml, 75 µg/ml และ 125 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งสรุปได้ว่าสารสกัด FT สามารถฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อได้ในปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอีก 2 ชนิด

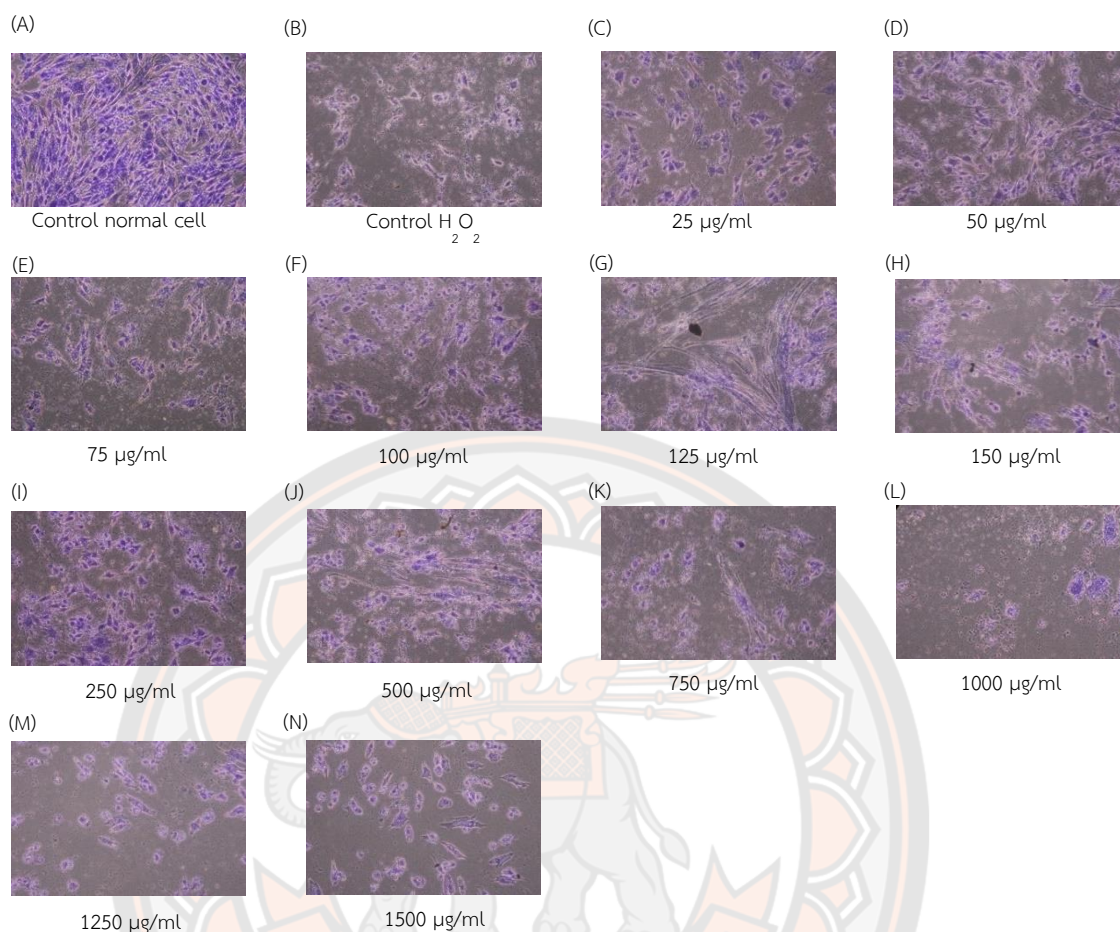


ภาพ 20 เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเลี้ยงด้วย crystal violet ภาพได้กล้องจุลทรรศน์ที่ความขยาย 40x ประกอบด้วย เซลล์ปกติ (A), เซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (B) และเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและได้รับสารสกัด SC ที่ความ 25 – 1,500  $\mu g/ml$  (C) - (N)



ภาพ 21 เซลล์กล้ามเนื้อหุ้ย้อมด้วย crystal violet ภาพได้กล้องจุลทรรศน์ที่ความขยาย 40x ประกอบด้วย เซลล์ปกติ (A), เซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (B) และเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและได้รับสารสกัด FT ที่ความ 25 – 1,500 µg/ml (C) - (N)



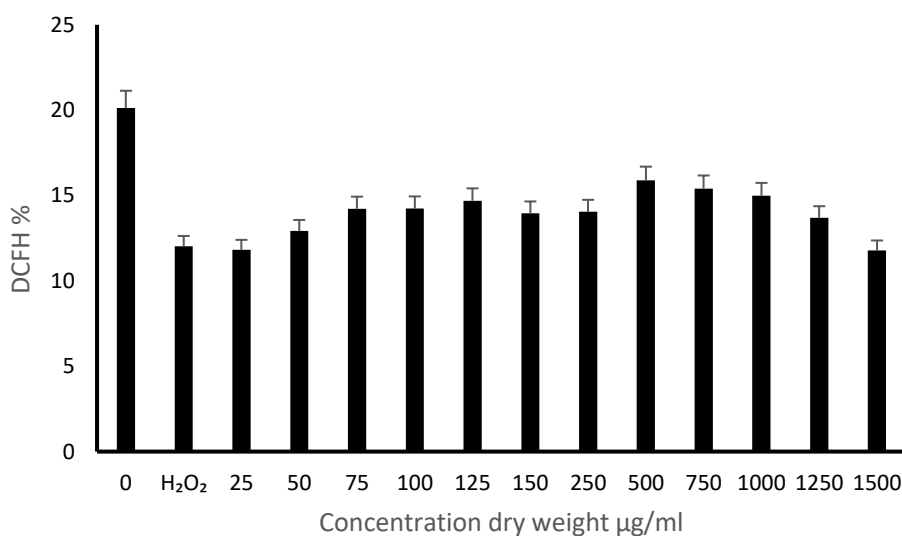
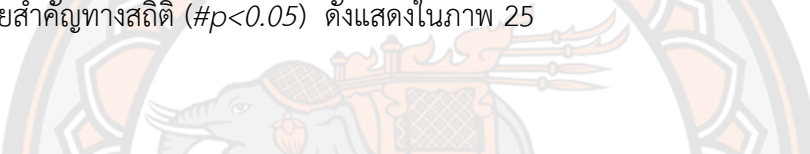


ภาพ 22 เซลล์กล้ามเนื้อหุ้ย้อมด้วย crystal violet ภาพได้กล้องจุลทรรศน์ที่ความขยาย 40x ประกอบด้วย เซลล์ปกติ (A), เซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (B) และเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและได้รับสารสกัด ASE ที่ความ 25 – 1,500 µg/ml (C) - (N)

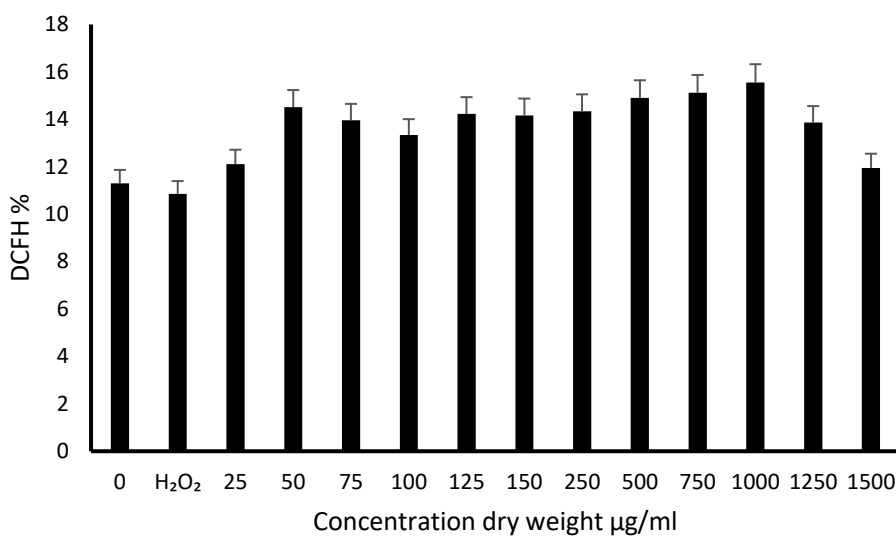
### ผลการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี DCHF Da Assay

จากการศึกษาผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ L6ทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดทั้ง 3 แบบ ในการลดระดับการสะสม ROS ภายในเซลล์กล้ามเนื้อหุ L6 โดยนำเซลล์ที่ differentiation ทดสอบ โดยการทดสอบจะแบ่งเป็น กลุ่มแรกคือกลุ่มควบคุม (normal cells) ซึ่งเลี้ยงในสภาวะปกติที่มีอาหาร complete medium กลุ่มที่ 2 คือสภาวะที่ได้รับเฉพาะ 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มที่ 3 ทริสารสกัดทั้ง 3 แบบ สารสกัด SC, สารสกัด FT และสารสกัด ASE ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250 และ 1500 ug/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มด้วย 2 uM CM-H2DCFDA เป็นเวลา 30 นาทีที่ 37°C จากนั้นจึงตรวจสอบ

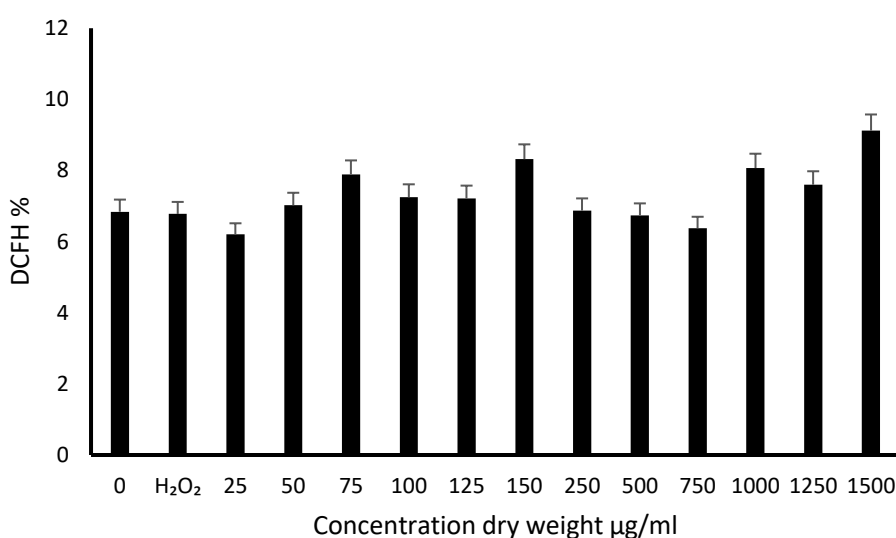
ปริมาณ ROS ในเซลล์ด้วยวิธี DCFH-DA assay ผลการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DCFH Da ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด SC, FT, ASE และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> กลุ่มสารสกัด SC มีค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ เท่ากับ 11.18%, 12.92%, 14.22%, 14.23%, 14.68%, 13.95%, 14.04%, 15.89%, 15.40%, 14.99%, 13.68%, 11.77% ตามลำดับ และ กลุ่มทรีท H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12.03% ซึ่งค่าที่ได้เทียบกับกลุ่มทรีท H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ไม่มีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $#p<0.05$ ) ดังแสดงในภาพ 23 กลุ่มสารสกัด FT มีค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ เท่ากับ 12.11%, 14.51%, 13.95%, 13.34%, 14.22%, 14.17%, 14.33%, 14.90%, 15.11%, 15.55% และ 13.86% และ 11.95% ตามลำดับ และ กลุ่มทรีท H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10.85% ซึ่งค่าที่ได้เทียบกับกลุ่มทรีท H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ไม่มีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $#p<0.05$ ) ดังแสดงในภาพ 24 กลุ่มสารสกัด ASE มีค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ เท่ากับ 6.20%, 7.02%, 7.89%, 7.25%, 7.21%, 8.32%, 6.87%, 6.74%, 6.38%, 8.07%, 7.60%, และ 9.12% และกลุ่มทรีท H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6.78% ซึ่งค่าที่ได้เทียบกับกลุ่มทรีท H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ไม่มีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $#p<0.05$ ) ดังแสดงในภาพ 25



ภาพ 23 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DCFH Da ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด SC ความเข้มข้น 0 -1,500 µg/ml



ภาพ 24 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DCHF Da ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด FT ความเข้มข้น 0 -1,500  $\mu\text{g/ml}$



ภาพ 25 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DCHF Da ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด PC ความเข้มข้น 0 -1,500  $\mu\text{g/ml}$

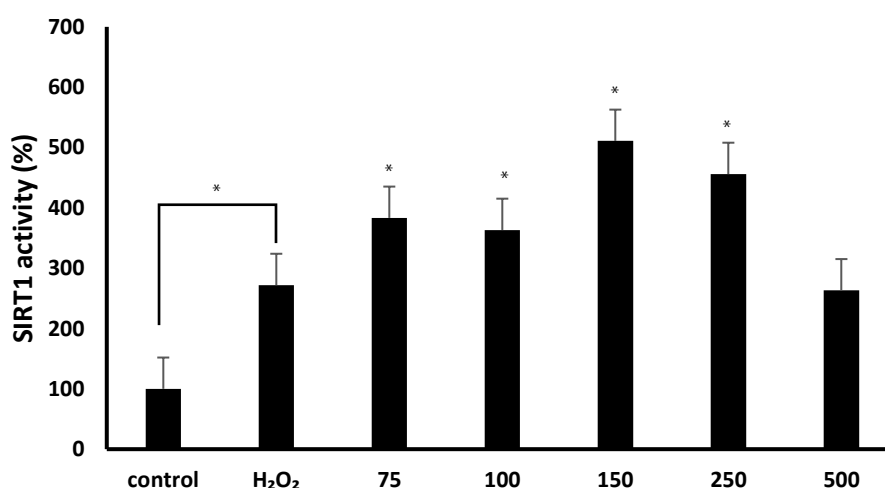
#### ผลการวัดปริมาณโปรตีน SIRT 1 โดย SIRT 1 Assay kit

จากการศึกษาผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ L6 เพื่อทำการทดสอบวัดปริมาณโปรตีน SIRT1 จากเซลล์กล้ามเนื้อ L6 ที่ ทำการ seed cell 10000 cell/well 6 well plate ในอาหาร



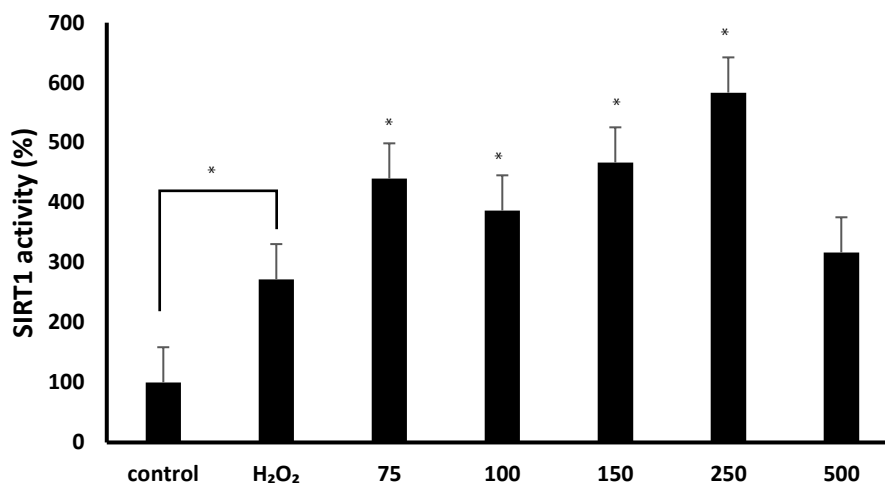
10% FBS complete media จากนั้นเพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อหนู L6 differentiate เป็นเซลล์กล้ามเนื้อโดยทำการเปลี่ยนอาหาร การลดปริมาณอาหารจาก 10% FBS complete media เป็น 2% FBS complete media เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์กล้ามเนื้อและมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 90-100% และเติม  $H_2O_2$  1 mM 1000  $\mu$ l/well เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสะสมอนุมูลอิสระเกิดความเสียหาย และทรีทสารสกัดทั้ง 2 แบบ สารสกัดที่ได้จากวิธีโซนิเคชัน (SC) และสารสกัดที่ได้จากการแช่เยือกแข็งละลาย Freeze thaw (FT) ที่ความเข้มข้น 0, 75, 100, 150, 250 และ 500  $\mu$ g/ml ซึ่งพบว่าปริมาณการแสดงออกของโปรตีน SIRT1 ในเซลล์กล้ามเนื้อหนู L6 หลังจากการทรีทสารสกัดเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่ทำการทรีทสารสกัด SC มีปริมาณการแสดงออกเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็นเซลล์ปกติ (Normal cells) ความเข้มข้น 0  $\mu$ g/ml จะเทียบให้เป็น 100% ซึ่งมีการแสดงออกอยู่แล้ว และกลุ่มทรีท  $H_2O_2$  272.00%  $\pm$  2.65 พบว่ากลุ่มที่ทำการทรีทสารสกัด SC มีปริมาณโปรตีน SIRT1 อยู่ที่ 383.33%  $\pm$  136.5, 363.33%  $\pm$  101.2, 510.89%  $\pm$  210.6, 456.07%  $\pm$  125.6 และ 263.22%  $\pm$  130.5 ตามลำดับ

และกลุ่มที่ทำการทรีทสารสกัด FT มีปริมาณการแสดงออกเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็นเซลล์ปกติ (Normal cells) ความเข้มข้น 0  $\mu$ g/ml จะเทียบให้เป็น 100% ซึ่งมีการแสดงออกอยู่แล้ว และกลุ่มทรีท  $H_2O_2$  272.00%  $\pm$  2.65 พบว่ากลุ่มที่ทำการทรีทสารสกัด FT มีปริมาณโปรตีน SIRT1 อยู่ที่ 440.00%  $\pm$  115.33, 386.67%  $\pm$  86.22, 466.67%  $\pm$  120.97, 583.33%  $\pm$  152.75 และ 316.67%  $\pm$  156.31 ตามลำดับ



ภาพ 26 เปรียบเทียบการวัดปริมาณโปรตีน SIRT 1 ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด SC ความเข้มข้น 0 -500  $\mu$ g/ml

หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทรีทด้วย  $H_2O_2$



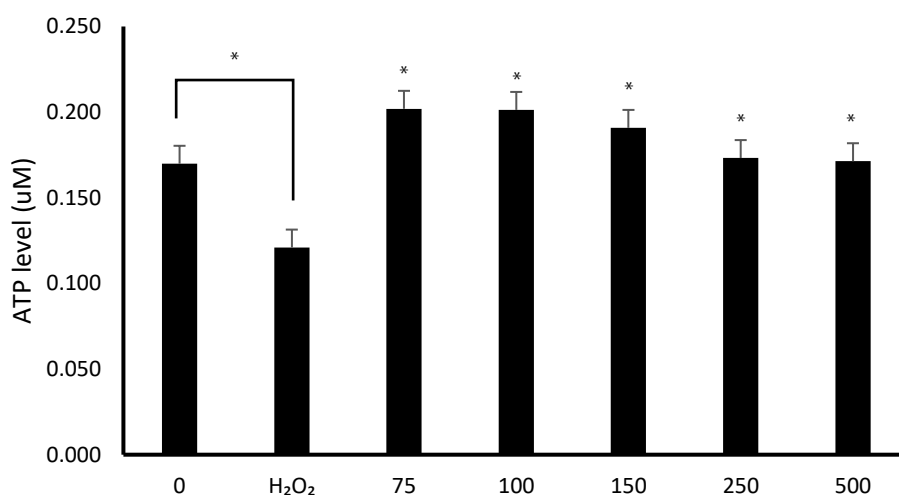
ภาพ 27 เปรียบเทียบการวัดปริมาณโปรตีน SIRT 1 ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด FT ความเข้มข้น 0 -500 µg/ml

หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทรีทด้วย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### ผลการวัดปริมาณ ATP โดย ATP Assay kit

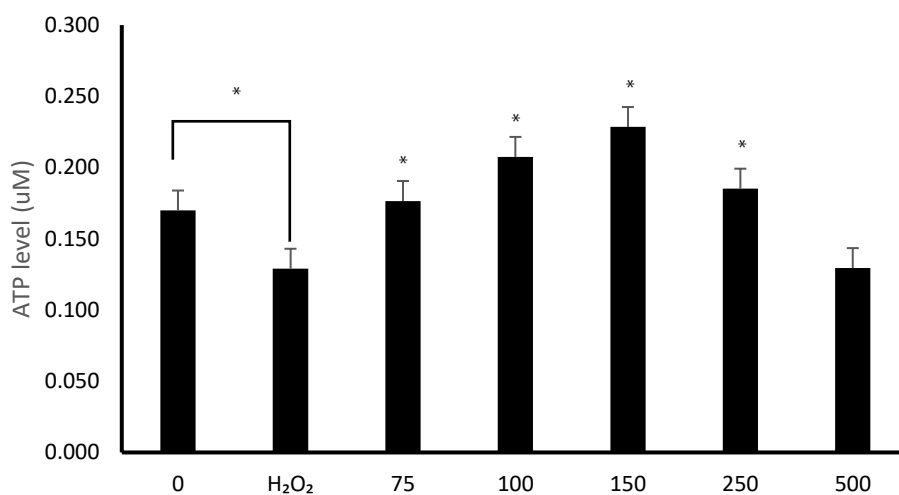
จากการศึกษาผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ L6 เพื่อทำการทดสอบปริมาณ ATP จากเซลล์กล้ามเนื้อ L6 โดยทำการ seed cell 10000 cell/well 6 well plate ในอาหาร 10% FBS complete media จากนั้นเพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อ L6 differentiate เป็นเซลล์กล้ามเนื้อโดยทำการเปลี่ยนอาหาร การลดปริมาณอาหารจาก 10% FBS complete media เป็น 2% FBS complete media เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์กล้ามเนื้อและมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 90-100% และเติม H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM 1000 µl/well เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสะสมอนุมูลอิสระเกิดความเสียหาย และทรีทสารสกัดทั้ง 2 แบบ สารสกัดที่ได้จากวิธีโซนิเคชัน (SC) และสารสกัดที่ได้จากการแช่เยือกแข็งละลาย Freeze thaw (FT) ที่ความเข้มข้น 0, 75, 100, 150, 250 และ 500 µg/ml ซึ่งพบว่าปริมาณ ATP ในเซลล์กล้ามเนื้อ L6 หลังจากการทรีทสารสกัดเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มที่เป็นเซลล์ปกติ (Normal cells) กลุ่มทรีท H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และกลุ่มที่ทำการทรีทสารสกัด SC มีปริมาณ ATP  $0.170 \pm 0.03$ ,  $0.121 \pm 0.44$ ,  $0.202 \pm 0.43$ ,  $0.201 \pm 0.45$ ,  $0.191 \pm 0.42$ ,  $0.173 \pm 0.50$  และ  $0.171 \pm 0.75$  µM ตามลำดับ และกลุ่มที่เป็นเซลล์ปกติ (Normal cells) กลุ่มทรีท H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และกลุ่มที่ทำการทรีทสารสกัด FT มีปริมาณ ATP  $0.170 \pm 0.00$ ,

$0.129 \pm 0.04$ ,  $0.177 \pm 0.05$ ,  $0.207 \pm 0.05$ ,  $0.228 \pm 0.02$ ,  $0.185 \pm 0.03$  และ  $0.129 \pm 0.06$   $\mu\text{M}$  ตามลำดับ



ภาพ 28 เปรียบเทียบการวัดปริมาณ ATP ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด SC ความเข้มข้น 0 -500  $\mu\text{g/ml}$

หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทรีทด้วย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



ภาพ 29 เปรียบเทียบการวัดปริมาณ ATP ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด FT ความเข้มข้น 0 -500  $\mu\text{g/ml}$

หมายเหตุ: \* $p < 0.05$  มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทรีทด้วย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

#### อภิปรายผล

#### การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิสโดยวิธี DPPH assay

ในการศึกษานี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิสโดยวิธี DPPH assay จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ สารสกัด SC, สารสกัด FT และสารสกัด ASE ด้วยการทดสอบ DPPH Assay พบว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (scavenging) เท่ากับ  $33.4 \pm 0.019\%$   $49.9 \pm 2.775\%$ , และ  $11.9 \pm 0.005\%$  ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2,000  $\mu\text{g/ml}$  เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ เทียบกับกลุ่มควบคุม ( $*p < 0.05$ ) แสดงดังภาพ 14 จากข้อมูลที่ได้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัด FT มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด ขณะที่สารสกัด ASE มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ต่ำสุด

จากการศึกษาของคุณ Wan-Loy Chu และคณะทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิสเป็นสารสกัดน้ำทำการเปรียบเทียบกับ vitamin C, vitamin E และ phycocyanin ที่ได้ทดสอบโดยวิธี DPPH assay ซึ่งสารสกัดน้ำจากสาหร่ายที่ได้มีเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (scavenging) เท่ากับ 40% ที่ความเข้มข้นที่ 400  $\mu\text{g/ml}$  เมื่อเทียบการสารของเราที่ได้ทำการสกัดพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ  $49.9 \pm 2.775$  ที่ความเข้มข้น 2,000  $\mu\text{g/ml}$  สาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเทินซิสเป็นที่รู้จักกันดีว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นผลมาจากโมเลกุลเช่น phycocyanin,  $\beta$ -carotene, tocopherol,  $\gamma$ -linolenic acid และสารประกอบฟีนอลิก

#### ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการอยู่รอดและความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

ในการศึกษานี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการอยู่รอดและความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ L6 ของสารสกัดจากสาหร่าย A. platensis สารสกัดทั้ง 3 แบบ สารสกัดที่ได้จากวิธีโซนิเคชัน (SC), สารสกัดที่ได้จากการแช่เยือกแข็งละลาย Freeze thaw (FT) และตกตะกอนด้วย Ammonium sulphate ทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAD-Sephadex G-25 (ASE) ที่ความเข้มข้น 0-1,500  $\mu\text{g/ml}$  จากนั้นทำการตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย Crystal violet assay ผล

การทดลองพบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดทั้ง 3 แบบ นั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณที่ได้รับ โดยพบว่าสารสกัด SC ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 750  $\mu\text{g/ml}$  สารสกัด FT ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 1,400  $\mu\text{g/ml}$  และ ASE ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 800  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงครึ่งหนึ่ง (IC50) ปริมาณความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นก็จะส่งผลต่ออัตราการรอดของเซลล์เพิ่มขึ้นแสดงว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบการสกัดทั้ง 3 แบบ จะเห็นได้ว่าสารสกัด FT มีความเป็นพิษที่ต่ำแม้มีความเข้มข้นที่สูง

### การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสำหรับอาร์โธรสไปรา ฟลาโวนอยด์ต่อการฟื้นฟูกล้ามเนื้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน

การสะสมของ ROS ภายในร่างกาย โดยพบว่าในเนื้อเยื่อของผู้สูงอายุจะมีการสร้างและสะสมอนุมูลอิสระมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งส่งผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ (Fulle et al., 2004) จากการศึกษาของคุณ Alessandra Bosutti และคณะ เซลล์ myoblasts C2C12 ที่ได้จากกล้ามเนื้อโครงร่างของหนูเมาส์ และ myotubes การเปลี่ยนแปลงกล้ามเนื้อโครงร่างและการเผาผลาญออกซิเดชัน โดยใช้  $\text{H}_2\text{O}_2$  500-100  $\mu\text{M}$  เป็นต้นแบบของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันโดยพบว่าผลของ  $\text{H}_2\text{O}_2$  เป็นระยะเวลา 24 ชม. มีผลการการแพร่ของเซลล์ (migration) ตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น ปิดกั้นการเคลื่อนที่ของเซลล์เกือบทั้งหมด และยังมีบล็อกการรวมตัวของเซลล์ดูจากที่จำนวน myotubes ลดลง โดยคุณ Alessandra Bosutti ทำการศึกษาในสาร resveratrol ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเครียดการเกิดออกซิเดชัน (Bosutti., et al., 2015). ซึ่งมีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสำหรับอาร์โธรสไปรา ฟลาโวนอยด์ที่สามารถช่วยลดความเครียดที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ในการศึกษาของผู้วิจัยได้เลือกใช้ความเข้มข้น 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นถึงลักษณะและรูปร่างกลม ซึ่งบ่งบอกถึงความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจาก  $\text{H}_2\text{O}_2$

### การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี DCHF Da Assay

จากการศึกษาผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ L6 ทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดทั้ง 3 แบบ ในการลดระดับการสะสม ROS ภายในเซลล์กล้ามเนื้อ L6 โดยนำเซลล์ที่ differentiation ทดสอบ โดยการทดสอบจะแบ่งเป็น กลุ่มแรกคือกลุ่มควบคุม (normal cells) ซึ่งเลี้ยงในสภาวะปกติที่มีอาหาร complete medium กลุ่มที่ 2 คือสภาวะที่ได้รับเฉพาะ 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มที่ 3 ทริทสารสกัดทั้ง 3 แบบ สารสกัด SC, สารสกัด FT และสารสกัด ASE ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250 และ 1500  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มด้วย 2  $\mu\text{M}$  CM-H2DCFDA เป็นเวลา 30 นาทีที่ 37°C เพอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล

อิสระโดยวิธี DCHF Da ในเซลล์กล้ามเนื้อของสารสกัด SC, FT, ASE และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ซึ่งการวัดปริมาณอนุมูลอิสระด้วยวิธี DCFH-Da ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการลดอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วย DCFH-Da ซึ่งค่าที่ได้ทั้ง 3 กลุ่มสารที่ทดสอบเทียบกับกลุ่มทรีท H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (\**p*<0.05)

จากการศึกษา Kang-Sik Seo และคณะ ลดความเครียดออกซิเดชันด้วย KL1333 วัดระดับ ROS ในไฟโบรบลาสต์ MELAS ทั้งสาม มีระดับ ROS ต่ำกว่า WT ไฟโบรบลาสต์ และจากการศึกษาของ Liu และคณะ พบว่ากรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นอะโรมาติก ได้แก่ ไทโรซีน ทรีปโตเฟน และฟีนิลอะลานีน สามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระเพื่อกำจัด ROS ได้ (Liu et al., 2015) และในการศึกษาของ Pyne และคณะ ได้ทำการศึกษางค์ประกอบของสาหร่าย *A. platensis* พบว่า *A. platensis* มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนอะโรมาติก ได้แก่ ทรีปโตเฟน และฟีนิลอะลานีนสูง (Pyne PK, 2017) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการลดการสะสมของ ROS แต่จากการศึกษาของผู้วิจัยซึ่งการวัดปริมาณอนุมูลอิสระด้วยวิธี DCFH-Da ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการลดอนุมูลอิสระเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี DCFH-Da

#### การวัดปริมาณโปรตีน SIRT 1 โดย SIRT 1 Assay kit

จากผลการศึกษาการแสดงออกถึงปริมาณของโปรตีน SIRT1 จะมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการฟื้นฟูเซลล์จากความเสียหายซึ่งเป็นกลไกอัตโนมัติของกลไก cell mechanism จากการศึกษาของสารสกัดจากสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิส สารสกัด SC สารสกัด FT ในการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อของเนื้อเยื่อจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมอนุมูลอิสระและเกิดความเสียหายของเซลล์กล้ามเนื้อ L6 โดยพบว่าสารสกัด SC และ FT ส่งผลให้มีการแสดงออกของปริมาณโปรตีน SIRT1 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการที่เซลล์มีการฟื้นฟูเซลล์จากความเสียหาย

การแสดงออกของปริมาณโปรตีน SIRT1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> กับกลุ่มควบคุม (normal cells) ปริมาณการแสดงออกของกลุ่ม H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (normal cells) ซึ่งปริมาณการแสดงออกของกลุ่ม H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> อาจเกิดจากหลังการทรีท H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> มีระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการเก็บเซลล์ไปทดสอบระยะเวลาตรงนี้เซลล์อาจมีการซ่อมแซมตัวเองจากกาถูกทำให้เสียหาย จึงมีการแสดงออกของโปรตีน SIRT1 ที่มากกว่ากลุ่มควบคุม (normal cells) ที่ไม่ได้รับความเสียหายของเซลล์

การกระตุ้นทางเภสัชวิทยาของโปรตีนหลายชนิดช่วยให้เกิด mitochondrial biogenesis ตัวอย่างเช่นสารประกอบโพลีฟีนอลิกเช่นเรสเวอราทรอล ที่ฟื้นฟูฟังก์ชัน mitochondrial ผ่านการทำงานของ SIRT1 ซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ PGC-1 $\alpha$  การกระตุ้นการทำงานของสารประกอบ AMPK ยังส่งเสริมการทำงานของไมโทคอนเดรียโดยการเพิ่มขึ้นการแสดงออกของยีน



เป้าหมาย PGC-1 $\alpha$  ที่เกี่ยวข้องกับการ mitochondrial biogenesis นอกจากนี้ปัจจัย transcription factor NF-E2 p45-related factor 2 (Nrf2) เป็นเป้าหมายสำหรับการฟื้นฟู mitochondrial function เนื่องจากควบคุมการตอบสนองของสารต้านอนุมูลอิสระ ควบคุมศักยภาพของเมมเบรนไมโทคอนเดรีย ควบคุมการออกซิเดชันของกรดไขมัน และ การทำงานของ oxidative phosphorylation (OXPHOS)

ซึ่งจากการศึกษาของคุณ Kang-Sik Seo และคณะ ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของปริมาณ SIRT1 ของ KL1333 ในเซลล์ C2C12 myoblasts, L6 myoblasts เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การทำงาน SIRT1 ในเซลล์ทั้งสองเส้น การเปิดใช้งานของ SIRT1 โดย NAD<sup>+</sup> ภายในเซลล์ที่สูงขึ้นจะควบคุมการทำงานของดับ โคเอนไซม์ B1 ส่งผลให้มีการกระตุ้น AMPK และ การเปิดใช้งาน SIRT1 และ AMPK แบบคู่พร้อมกันจะเพิ่มขึ้นการเผาผลาญภายในเซลล์ การแสดงออกของปริมาณโปรตีน SIRT1 ของการศึกษาของคุณ Kang-Sik Seo และคณะ ทำการเทียบกลุ่มควบคุม C2C12 และ L6 myoblasts และ ทริทด้วย 1 and 2  $\mu$ M KL1333 มีค่าการแสดงออกของปริมาณโปรตีน SIRT1 กลุ่มควบคุมทั้ง C2C12 และ L6 100% กลุ่ม C2C12 และ L6 myoblasts ทริทด้วย 1 and 2  $\mu$ M KL1333 110% และ 120% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสารสกัด SC และ FT ที่ความเข้มข้น 75  $\mu$ g/ml ส่งผลให้มีการแสดงออกของปริมาณโปรตีน SIRT1 383.33%  $\pm$  136.5 และ 440.00%  $\pm$  115.33 ตามลำดับ

#### การวัดปริมาณ ATP โดย ATP Assay kit

จากผลการศึกษาการวัดปริมาณ ATP จะมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการฟื้นฟูเซลล์จากความเสียหายของเซลล์ จากการศึกษาของสารสกัดจากสาหร่ายอาร์โธรสไปรา พลาเทินซิส สารสกัด SC สารสกัด FT ในการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อหนูจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการสะสมอนุมูลอิสระและเกิดความเสียหายของเซลล์กล้ามเนื้อ L6 โดยพบว่าสารสกัด SC ที่ความเข้มข้น 75  $\mu$ g/ml ส่งผลให้มีการแสดงออกของปริมาณ ATP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ เทียบกับกลุ่มควบคุม H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (\* $p$ <0.05) แสดงดังภาพ 28 พบว่าสารสกัด FT ที่ความเข้มข้น 75  $\mu$ g/ml ส่งผลให้มีการแสดงออกของปริมาณ ATP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ เทียบกับกลุ่มควบคุม H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (\* $p$ <0.05) แสดงดังภาพ 29 เมื่อเซลล์ได้รับสารสกัดจะส่งผลให้เซลล์เกิด cell proliferation การเพิ่มจำนวนของเซลล์แสดงถึงการฟื้นฟูเซลล์จากความเสียหายของเซลล์ เมื่อเซลล์เกิด cell proliferation ทำให้จำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้นและทำให้มีไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น ตัวไมโทคอนเดรียจะสร้างพลังงานออกมาใช้ภายในเซลล์ ดังนั้นการวัดปริมาณ ATP ภายในเซลล์จึงมีปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อทำการเทียบกับกลุ่มควบคุม ทริทด้วย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

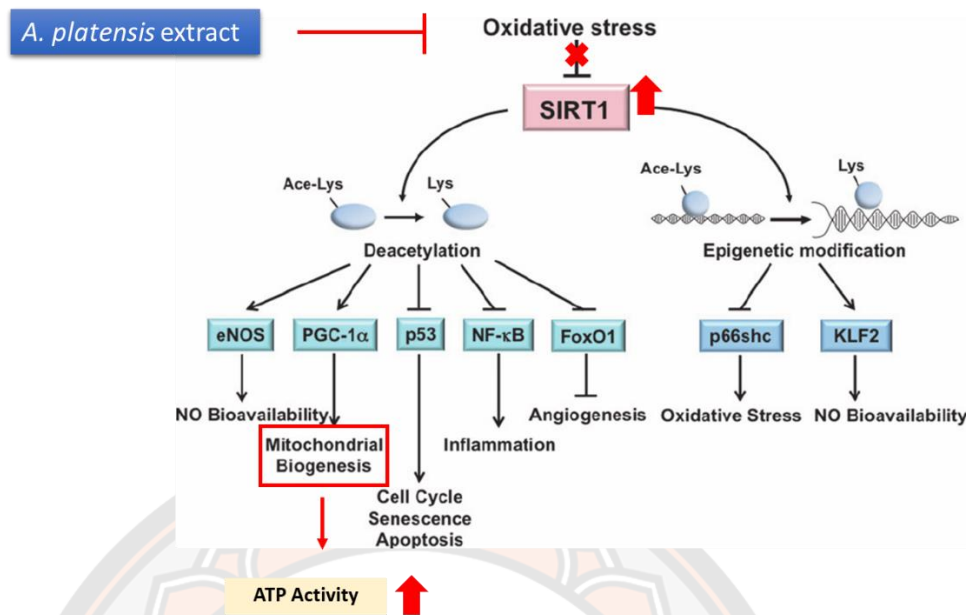
ซึ่งจากการศึกษาของคุณ Kang-Sik Seo และคณะ ที่มีการศึกษาสาร KL1333 ต่อบทบาทในการสร้างเซลล์และหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย เนื่องจากมีบทบาทในการสร้างเซลล์และหน้าที่ของไมโท

คอนเดรียที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการออกซิเดชันฟอสโฟไรเลชัน (OXPHOS) และ ความเครียดออกซิเดชัน จากการสังเกต KL1333 เพิ่มการทำงาน PGC-1 $\alpha$  และตรวจสอบพบว่า KL1333 สามารถฟื้นฟูการผลิต ATP ในไฟโบร بلاสต์ของมนุษย์ที่ได้จากผู้ป่วย MELAS

### สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดของสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิสด้วย DPPH assay สารสกัด FT มีเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) สูงสุดที่ 49.9% รองลงมาคือสารสกัด SC และสารสกัด ASE ที่ 33.4% และ 11.9% ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 2,000  $\mu\text{g/ml}$  นอกจากนี้สารสกัด FT มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอีก 2 ชนิด โดยมีค่า LD50 หรือความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตในอัตรา 50% เท่ากับ 1,400  $\mu\text{g/ml}$  ขณะที่ค่า LD50 ของสารสกัด SC และสารสกัด ASE มีค่าเท่ากับ 750  $\mu\text{g/ml}$  และ 800  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบฤทธิ์ในการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อหนูหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน ผลปรากฏว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ในการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อหนู โดยใช้สารสกัด FT ในปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 75  $\mu\text{g/ml}$  เมื่อเทียบกับสารสกัด SC และสารสกัด ASE ที่ต้องใช้สูงถึง 150  $\mu\text{g/ml}$  และ 125  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงกล้ามเนื้อโครงร่างและการเผาผลาญออกซิเดชัน โดยใช้  $\text{H}_2\text{O}_2$  เป็นต้นแบบของความเครียดออกซิเดชันโดยศึกษาสาร ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเครียดการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิสที่ช่วยลดความเครียดที่เกิดจากอนุมูลอิสระส่วนหนึ่งอาจยังยั้งความเครียดออกซิเดชันในส่วนของ path way SIRT1 และส่งผลให้ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน SIRT1 มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับสารสกัดและยังส่งผลให้เกิดการเพิ่มหรือสร้างไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial biogenesis) ส่งผลให้มีการสร้างพลังงานออกมาเพิ่มขึ้น หมายถึงเซลล์กล้ามเนื้อมีการฟื้นฟูเมื่อได้รับสารสกัดหลังจากที่เซลล์ถูกทำลายเกิดเกิดความเสียหายของเซลล์ สารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิสที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหาร Zarblue และสกัดด้วยวิธี freeze thaw มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงปริมาณผลผลิตที่สูง %yield อีกทั้งมีความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อต่ำ และสามารถฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อหนูจากการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันแม้ใช้ในปริมาณต่ำ มีการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการฟื้นฟูเซลล์ SIRT1 สูง ซึ่งสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเท็นซิส สกัดด้วยวิธี freeze thaw มีศักยภาพในการนำมาศึกษาต่อเพิ่มเติมของในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ และในเชิงลึกของกลไกการแสดงออกการช่วยฟื้นฟูกล้ามเนื้อต่อไปในอนาคต



ภาพ 30 ภาพรวมของงานวิจัย

ตาราง 6 สรุปภาพรวมของผลการทดลองของสารสกัด

Extracts	Antioxidant	DCFH-Da	SIRT1 (At 150 $\mu$ g/ml)	ATP
SC	33.4 $\pm$ 0.019 %	-	510.89% $\pm$ 210.6	0.202 $\pm$ 0.43 $\mu$ M
FT	49.9 $\pm$ 2.775%	-	466.67% $\pm$ 120.97	0.228 $\pm$ 0.02 $\mu$ M
ASE	11.9 $\pm$ 0.005%	-	-	-

# บรรณานุกรม



Adiba, B. D.; et al. (2008). Preliminary characterization of food tablets from date (*Phoenix dactylifera* L.) and spirulina (*Spirulina* sp.) powders. *Powder Technology*. 208: 725–730.

Asghari, A.; et al. (2016). A Review on Antioxidant Properties of Spirulin. *Journal of Applied Biotechnology Reports*.

Bachchhav, M. B., Kulkarni, M. V., & Ingale, A. G. (2017). Enhanced phycocyanin production from *Spirulina platensis* using light emitting diode. *Journal of The Institution of Engineers (India): Series E*, 98(1), 41-45.

Becker, E. W. (2007) Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv*, 25, 207-210.

Castenholz, R. W. (1989). Oxygenic photosynthetic bacteria, group I, cyanobacteria, subsection III, order Oscillatoriales in Bryant, M. P., Pfennig, N. & Holt, J. G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 3*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1771–1780.

Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Triratana, P., Loha, V., Tia, S. & Bunnag, B. (2013) Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. *Int J Biol Macromolec*, 58, 73-78

Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological reviews*, 47(4), 551.

Clanton, T. L., Zuo, L. & Klawitter, P. (1999) Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222, 253-262.

Devi, M. A., & Venkataraman, L. V. (1983). Hypocholesterolemic effect of blue green algae *Spirulina platensis* in albino rats [India]. *Nutrition reports international*.

Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J. L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S. R. & Mitch, W. E. (2004) Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest*, 113, 115–123.

Fulle, S., et al. (2004). "The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing." *Experimental Gerontology* 39(1): 17-24.

Giergiel, M., Lopucki, M., Stachowicz, N. & Kankofer, M. (2012) The influence of age and gender on antioxidant enzyme activities in humans and laboratory animals. *Aging Clin Exp Res*, 24(6), 561-569.

Hirani V, Blyth F, Naganathan V, et al. (2015). Sarcopenia is associated with incident disability, institutionalization, and mortality in community-dwelling older men: The concord health and ageing in men project. *JAMDA*.; 16(7): 607-13.

Kannaujiya, V. K., & Sinha, R. P. (2016). Thermokinetic stability of phycocyanin and phycoerythrin in food-grade preservatives. *Journal of applied phycology*, 28(2), 1063-1070.

Kissoudi, M., Sarakatsianos, I., & Samanidou, V. (2018). Isolation and purification of food - grade C - phycocyanin from *Arthrospira platensis* and its determination in confectionery by HPLC with diode array detection. *Journal of separation science*, 41(4), 975-981.

Kuddus, M., & Ramteke, P. W. (2012). Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. *Critical reviews in microbiology*, 38(4), 330-338.

Lee, D. H. (2010). Sirt1 as a New Therapeutic Target in Metabolic and Age-Related Diseases. *Chonnam Medical Journal*, 46(2), 67.



Lee, N. K., Oh, H. M., Kim, H. S. & Ahn, C. Y. (2017) Higher production of C-phycoyanin by nitrogen-free (diazotrophic) cultivation of *Nostoc* sp. NK and simplified extraction by dark-cold shock. *Biores Technol*, 227, 164-170.

Moraes, C. C., Sala, L., Cerveira, G. P., & Kalil, S. J. (2011). C-phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 45-49.

Rossano, R., Ungaro, N., D'Ambrosio, A., Liuzzi, G. M., & Riccio, P. (2003). Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander. *Journal of biotechnology*, 101(3), 289-293.

Román, R. B., Alvarez-Pez, J. M., Fernández, F. A., & Grima, E. M. (2002). Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, 93(1), 73-85.

Sajilata, M.G., Singhal, R.S. & Kamat, M.Y. (2008) Fractionation of lipids and purification of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis*. *Food Chem*, 109, 580-586.

Seo KS et al. (2018). KL1333, a Novel NAD<sup>+</sup> Modulator, Improves Energy Metabolism and Mitochondrial Dysfunction in MELAS Fibroblasts. *Front Neurol* 9:552

Silveira, S. T., Burkert, J. F. M., Costa, J. A. V., Burkert, C. A. V. & Kalil, S. J. (2007). Optimization of phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresour Technol*, 98, 1629–1634.

Song, W., Zhao, C., & Wang, S. (2013). A large-scale preparation method of high purity C-phycoyanin. *Int J Biosci Biochem Bioinforma*, 3, 293-297.

Steinbacher, P. & Eckl, P. (2015) Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules*, 5, 356-377.

Supinski, G. (1998) Free radical induced respiratory muscle dysfunction. *Mol Cell Biochem*, 179, 99-110.

Tidball, J. G. (2011) Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol*, 1, 2029–2062.

Tatsuura, S., Furuki, M., Sato, Y., Iwasa, I., Tian, M. I. N. Q. U. A. N., & Mitsu, H. (2003). Semiconductor carbon nanotubes as ultrafast switching materials for optical telecommunications. *Advanced Materials*, 15(6), 534-537.

Tomaselli, L. (1997) Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in Vonshak, A. (eds.) *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology. Taylor and Francis Ltd, London, pp. 1-16.

Vonshak, A. (ed.). (1997). *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-biology and Biotechnology. London: Taylor & Francis.

Zarrouk, C. (1966). Contribution a l'etude d'une Cyanophycee. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina mixima*. Thesis. University of Paris, France.