

ผลของสารสกัด สาหร่ายอาร์โธรสไปรา พลาเท็นซิส ต่อการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อหนูจากภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Recovery Effect of *Arthrospira platensis* Extracts Against H₂O₂-inducing Oxidative Stress in Rat Skeletal Muscle Cells

สิริลักษณ์ สันสนาะ (Siriluk Sansanor)* ดร.กฤษณ์ ตันตนะรัตน์ (Dr.Krit Tantanarat)** ดร. อำนาจ เพชรรุ่งนภา (Dr.Amnat Phetrungnapha)** ดร.สรารัฐ สัตยาภาวีย์ (Dr.Sarawut Sattayakawee)***

บทคัดย่อ

อนุมูลอิสระซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน เป็นสาเหตุหนึ่งของการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อ การช่วยฟื้นฟูกล้ามเนื้อทำได้โดยการเติมสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยชะลอการสะสมของสารอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดจากสาหร่ายอาร์โธรสไปรา พลาเท็นซิส มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จึงมีการดำเนินการวิจัย โดยเปรียบเทียบสารสกัดที่ได้จากกระบวนการสกัด 3 วิธี คือ การแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียง การแช่เยือกแข็งละลาย และการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียม แล้ววิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay จากนั้นจึงศึกษาความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการฟื้นฟูกล้ามเนื้อหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด 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 ชนิดมีฤทธิ์ในการฟื้นฟูกล้ามเนื้อหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฟื้นฟูกล้ามเนื้อได้เท่ากับ 150 µg/ml, 75 µg/ml และ 125 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดแบบแช่เยือกแข็งละลายมีศักยภาพมาใช้เป็นส่วนประกอบเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและช่วยชะลอการสูญเสียกล้ามเนื้อได้

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 at least adding antioxidants to maintain low level of free radicals. 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 H₂O₂ 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. LD50 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 extract from FT showed a promising sign and can be used as ingredient for dietary supplements to promote antioxidant activity and alleviation of muscle wasting.

คำสำคัญ: สาหร่ายอาร์โธรสไปรา พลาเท็นซิส เซลล์กล้ามเนื้อหนู สารต้านอนุมูลอิสระ

Keywords: *Arthrospira platensis*, Rat skeletal muscle cells, Antioxidants

*นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

***อาจารย์ สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทนำ

การสูญเสียมวลกล้ามเนื้อสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อได้ร่างกายออกกำลังอย่างหนัก ร่างกายอยู่ในภาวะเครียด หรือเมื่ออายุมากขึ้น โดยกลไกของการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อเกิดขึ้นจากความเครียดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นผลมาจากการสะสมของสารอนุมูลอิสระที่มาจากปัจจัยภายนอก เช่น รังสียูวี เชื้อโรค มลพิษ และปัจจัยภายใน เช่น ความเครียด การออกกำลังกายมากเกินไป พฤติกรรมการ ดื่ม กิน หรือสูบบุหรี่ โดยกลุ่มเสี่ยงที่การสูญเสียมวลกล้ามเนื้อมากที่สุดจะพบในผู้สูงอายุ เมื่อมวลกล้ามเนื้อลดลงก็ส่งผลให้ความแข็งแรงลดลงตามไปด้วย หนึ่งในปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญทำให้เกิดภาวะมวลกล้ามเนื้อลดลงคือการสะสมของ ROS โดยพบว่าในเนื้อเยื่อของผู้สูงอายุมีการสร้างอนุมูลอิสระมากขึ้นอย่างเด่นชัด (Fulle et al., 2004) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการลดลงของ anabolic hormones จึงทำให้การสังเคราะห์โปรตีนในกล้ามเนื้อลดลง อีกทั้ง ROS สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จนเกิดเป็นผลกระทบต่อเนื่องไม่ว่าจะเป็น Lipid peroxidation, Protein Oxidation หรือ DNA oxidation และยิ่งไปกว่านั้น ROS ยังเป็นต้นเหตุให้เกิดการสลายของกล้ามเนื้อผ่านการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน จึงทำให้ผู้สูงอายุหลายคนจึงประสบกับปัญหาภาวะมวลกล้ามเนื้อน้อยที่อาจส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวัน โดยทั่วไปคนเราจะมียอดมวลกล้ามเนื้อสูงสุด (Peak Muscle Mass) ที่ช่วงอายุ 30-40 ปี หลังจากอายุ 40 ปี มวลกล้ามเนื้อจะเริ่มลดลงร้อยละ 1-2 ต่อปี ในช่วงแรกอาจจะยังไม่เห็นถึงความเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อมีอายุช่วง 50-60 ปี ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อก็จะลดลงด้วย ประมาณร้อยละ 1.5 ต่อปี และลดลงเร็วขึ้นตามอายุที่เพิ่มสูงขึ้น (von Haehling et al., 2010) จนเริ่มมีผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวันหลังอายุ 65 ปี ดังนั้นการควบคุมระดับการสะสมปริมาณ ROS ในผู้สูงอายุจะสามารถชะลอการสลายของมวลกล้ามเนื้อได้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในศึกษาผลของสารสกัดจากสาหร่ายอาร์โธรสไปรา ปลาเท็นซิสต่อการลดระดับสารอนุมูลอิสระในเซลล์กล้ามเนื้อ ควบคู่ไปกับการช่วยฟื้นฟูกล้ามเนื้อจากความเครียดออกซิเดชัน เพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมช่วยฟื้นฟูกล้ามเนื้อต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปรา ปลาเท็นซิส ต่อการปกป้องเซลล์กล้ามเนื้อ L6 จากการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน

วิธีการวิจัย

การเลี้ยงสาหร่ายอาร์โธรสไปรา ปลาเท็นซิส

ดำเนินการเลี้ยงและเก็บรักษาสาหร่ายอาร์โธรสไปรา ปลาเท็นซิส ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตร Zarblue (สราวุธ และคณะ, 2563) ปริมาตร 1 L ความเข้มข้นของสาหร่ายเริ่มต้นคำนวณจากค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (OD_{560}) เท่ากับ 0.3 ± 0.50 ทำการเลี้ยงสาหร่าย ณ อุณหภูมิ 30°C ภายใต้แสงขาว 5,000 lux สลับมืด (16:8 hr.) และให้อากาศตลอด 24 hr เลี้ยงสาหร่ายจนกระทั่งครบ 25 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายผ่านการกรองภายใต้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ด้วยกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 37 ไมโครเมตร ทำการล้างสาหร่ายด้วยน้ำกลั่นก่อนจะนำไปสกัดสาร

การสกัดสารจากสาหร่ายอาร์โธรสไปรา ปลาเท็นซิส

สารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปรา ปลาเท็นซิสจะผ่านกรรมวิธีการสกัด 3 รูปแบบ ดังนี้

1. การสกัดด้วยวิธีแตกเซลล์โดยใช้คลื่นเสียง (sonicator)

ทำการแตกเซลล์โดยใช้คลื่นเสียง นำสารละลายมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) จนได้เป็นสารสกัดชนิดผง ซึ่งต่อจากนี้เรียกว่า สารสกัด SC

2. การสกัดด้วยวิธีแช่เยือกแข็งละลาย (freeze thaw)

ทำการการสกัดด้วยวิธีแช่เยือกแข็งละลาย และเก็บส่วนสารละลายมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) จนได้เป็นสารสกัดชนิดผง ซึ่งต่อจากนี้เรียกว่า สารสกัด FT

3. การสกัดด้วยวิธีแช่เยือกแข็งละลาย (freeze thaw) และตกตะกอนด้วย ammonium sulphate

ทำการการสกัดด้วยวิธีแช่เยือกแข็งละลาย (freeze thaw) และตกตะกอนด้วย ammonium sulphate และนำสารสกัดที่ได้ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) จนได้เป็นสารสกัดชนิดผง ซึ่งต่อจากนี้เรียกว่า สารสกัด ASE

สารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปรา พลาเทินซิสจะผ่านกรรมวิธีการสกัด 3 รูปแบบ วิธีการสกัดและขั้นตอน เป็นการได้มาจากการเตรียมในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปรา พลาเทินซิสโดยวิธี DPPH assay

ดำเนินการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบ DPPH assay ในระดับหลอดทดลองของสารสกัดจากสาหร่ายอาร์โธรสไปรา พลาเทินซิส ทั้ง 3 ชนิด โดยเริ่มจาก reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล (methanol) สารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Seo et al., 2013). โดยใช้อัตราส่วนสารละลาย DPPH 190 μ l ต่อ 10 μ l ตัวอย่าง ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีแล้วทำการวัด ที่ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (OD_{517})

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

เมื่อ AA = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

AB = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปรา พลาเทินซิสในเซลล์กล้ามเนื้อ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเริ่มต้นจาก การเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อ L6 ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นจำนวน 1,000 cell/well ใน 96 well plate เติมน้ำอาหาร 10% FBS complete media เพื่อให้เซลล์กล้ามเนื้อ L6 เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อ จะต้องลดปริมาณอาหารจาก 10% FBS complete media เป็น 2% FBS complete media เมื่อเซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์กล้ามเนื้อและมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 90-100% จึงทำการเติม สารสกัดทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัด SC, สารสกัด FT และสารสกัด ASE โดยระดับความเข้มข้นของสารสกัดในการทดสอบอยู่ที่ 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250 และ 1500 μ g/ml และบ่มไว้เป็นเวลา 24 hr. จากนั้นจึงวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์กล้ามเนื้อด้วยการทดสอบ crystal violet assay โดยนำอาหารและสารสกัดที่เติมลงไปก่อนหน้านี้ออก ล้างเซลล์ด้วย PBS buffer และทำการเติม 0.5% w/v crystal violet ปริมาตร 50 μ l/well บ่มไว้เป็นเวลา 10 min จากนั้นทำการล้างออกด้วยน้ำกลั่น แล้วเติม 100% DMSO ปริมาตร 200 μ l/well นำมาวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร (OD_{590})

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปรา พลาเทินซิสต่อการฟื้นฟูกล้ามเนื้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน

มีการศึกษา myoblasts C2C12 ที่ได้จากกล้ามเนื้อโครงร่างของหนูเมาส์ และ myotubes การเปลี่ยนแปลงกล้ามเนื้อโครงร่างและการเผาผลาญออกซิเดชันในการมี และไม่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยใช้ H_2O_2 เป็นต้นแบบของความเครียดออกซิเดชัน พบว่าความเข้มข้นของ ROS ต่ำ และ ROS ในปริมาณที่สูง มีผลเสียต่อการอยู่รอดการมีชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อ เสถียรภาพของไมโทคอนเดรีย และความยืดหยุ่นของกล้ามเนื้อ ในขณะที่ปริมาณต่ำกระตุ้นการแพร่ของเซลล์ และการหยุดวัฏจักรของเซลล์ (Bosutti et al., 2015).

นำเซลล์กล้ามเนื้อที่ผ่านการย้อม crystal violet มาศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 4x, 10x และ 40x และบันทึกผลการทดลอง

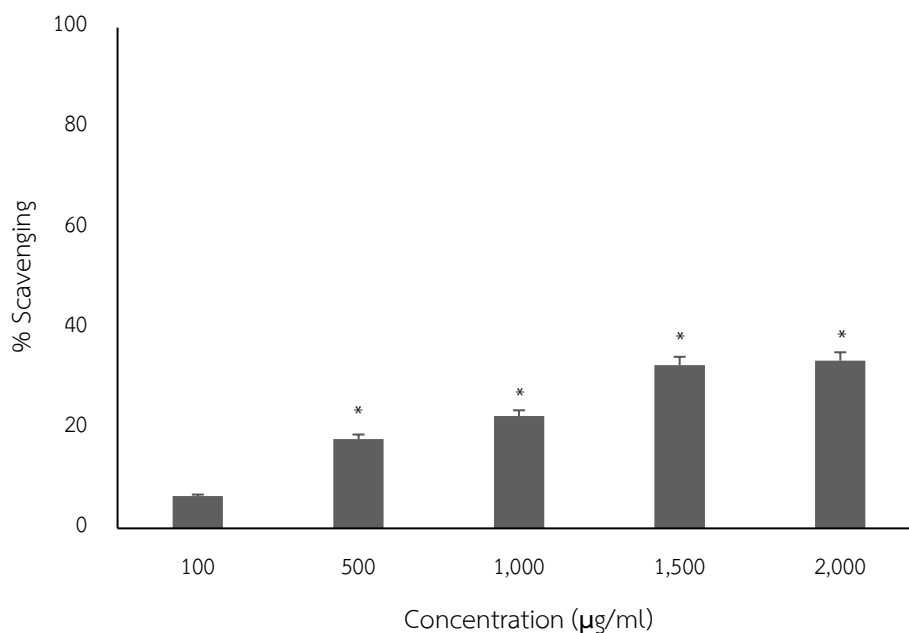
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ดำเนินการทดลองแต่ละกิจกรรมจำนวน 3 ครั้ง (n=3) และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\pm$ S.D.) จากนั้นนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

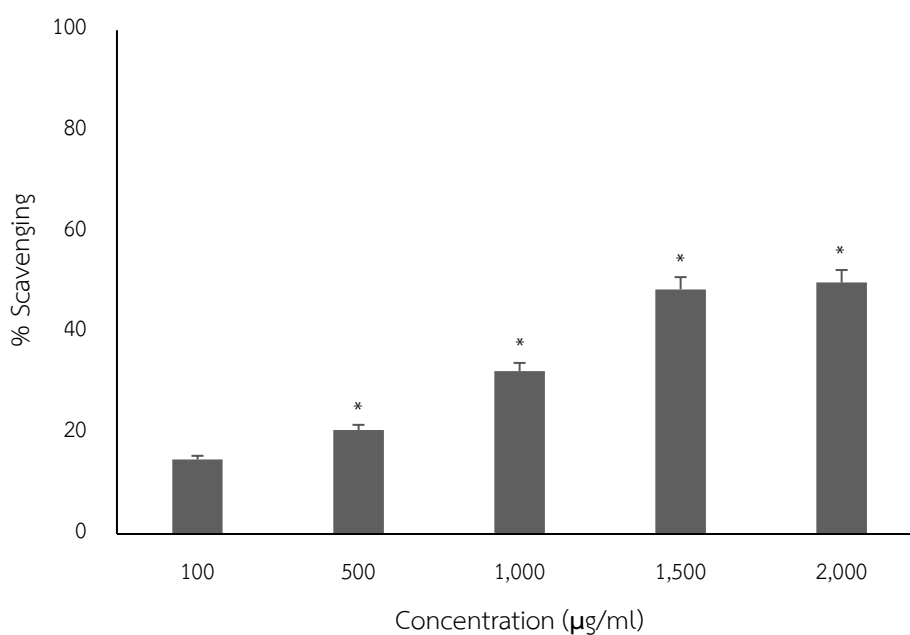
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเทนิซิสโดยวิธี DPPH assay

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ สารสกัด SC, สารสกัด FT และสารสกัด ASE ด้วยการทดสอบ DPPH Assay พบว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด เทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) เท่ากับ 33.4 ± 0.019 % 49.9 ± 2.775 %, และ 11.9 ± 0.005 % ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 2,000 μ g/ml จากข้อมูลที่ได้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัด FT มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด ขณะที่สารสกัด ASE มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ต่ำสุด



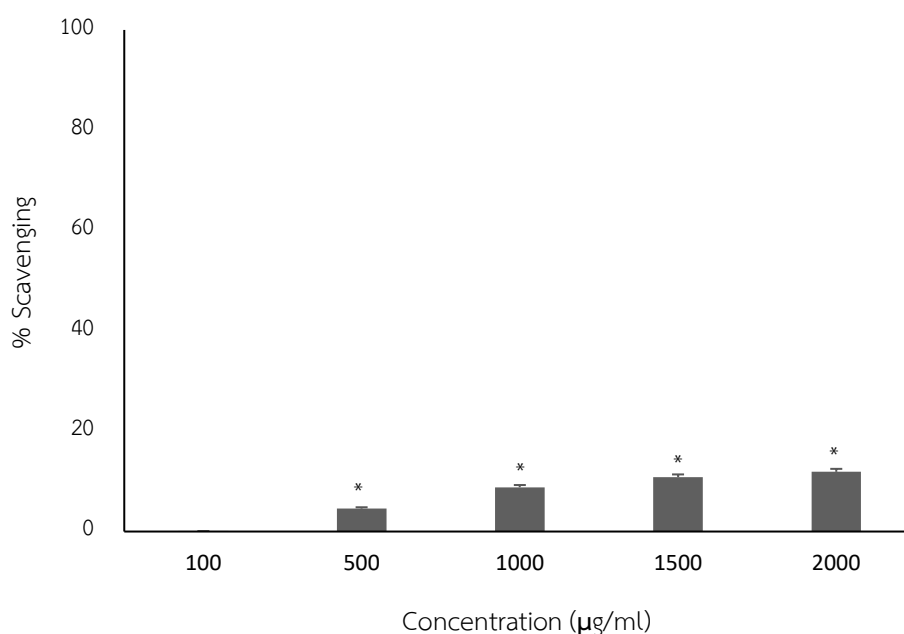
ภาพที่ 1 เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) ด้วยการทดสอบ DPPH assay ของสารสกัด SC ความเข้มข้น 100, 500, 1,000, 1,500, 2,000 μ g/ml

หมายเหตุ: * $p < 0.05$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 100 μ g/ml



ภาพที่ 2 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 µg/ml

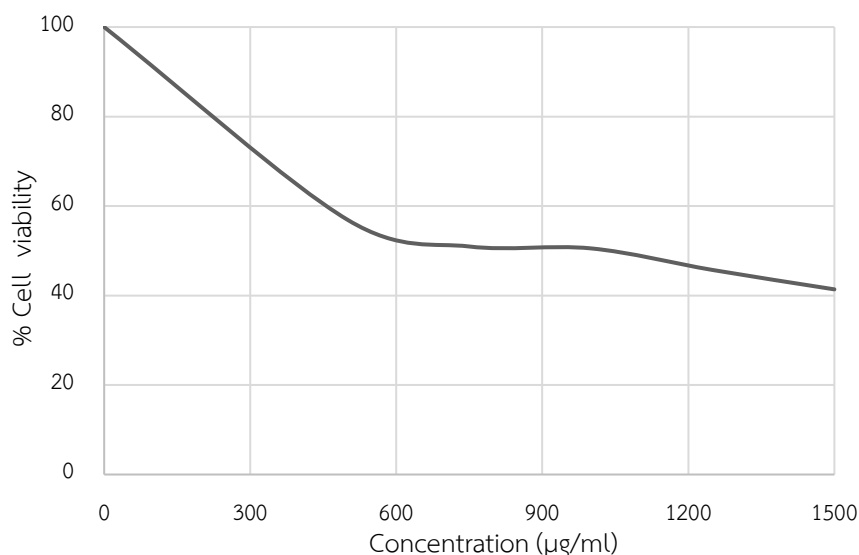


ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) ด้วยการทดสอบ DPPH assay ของสารสกัด ASE ความเข้มข้น 100, 500, 1,000, 1,500, 2,000 µg/ml

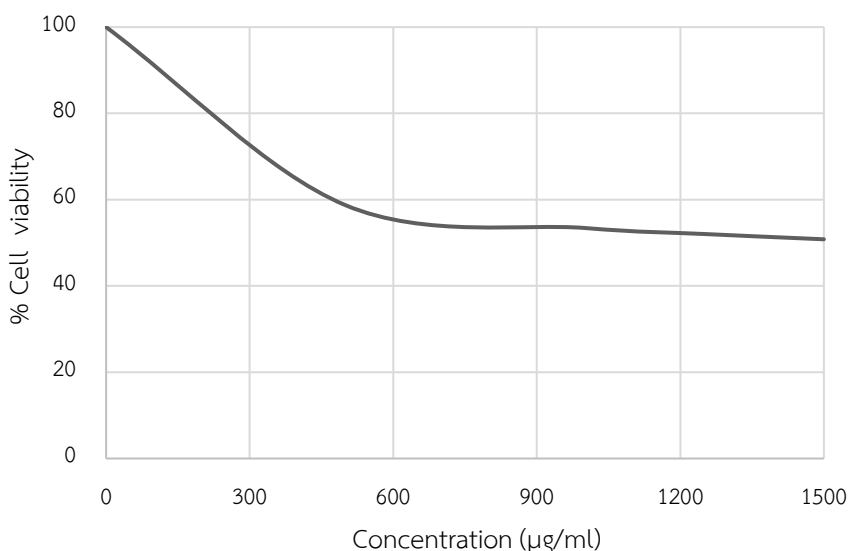
หมายเหตุ: * $p < 0.05$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับความเข้มข้น 100 µg/ml

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดอาร์โธรสไปรา พลาเทินซิสในเซลล์กล้ามเนื้อหนู

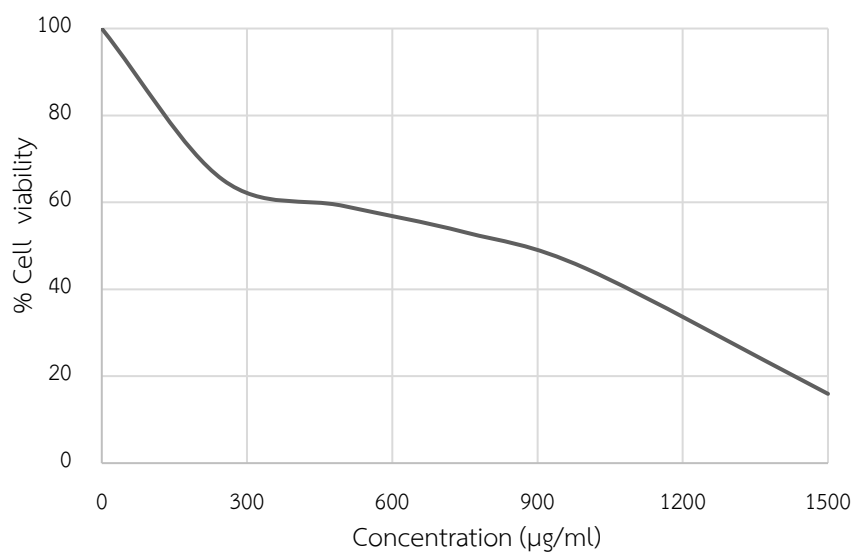
จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนูของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดด้วยวิธี crystal violet assay พบว่า ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัด SC, สารสกัด FT และสารสกัด ASE ที่ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหนูมีอัตราการรอด 50% (LD50) เท่ากับ 750 $\mu\text{g/ml}$, 1,400 $\mu\text{g/ml}$ และ 800 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัด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



ภาพที่ 4 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อหนูในสารสกัด SC ความเข้มข้น 0 – 1,500 $\mu\text{g/ml}$



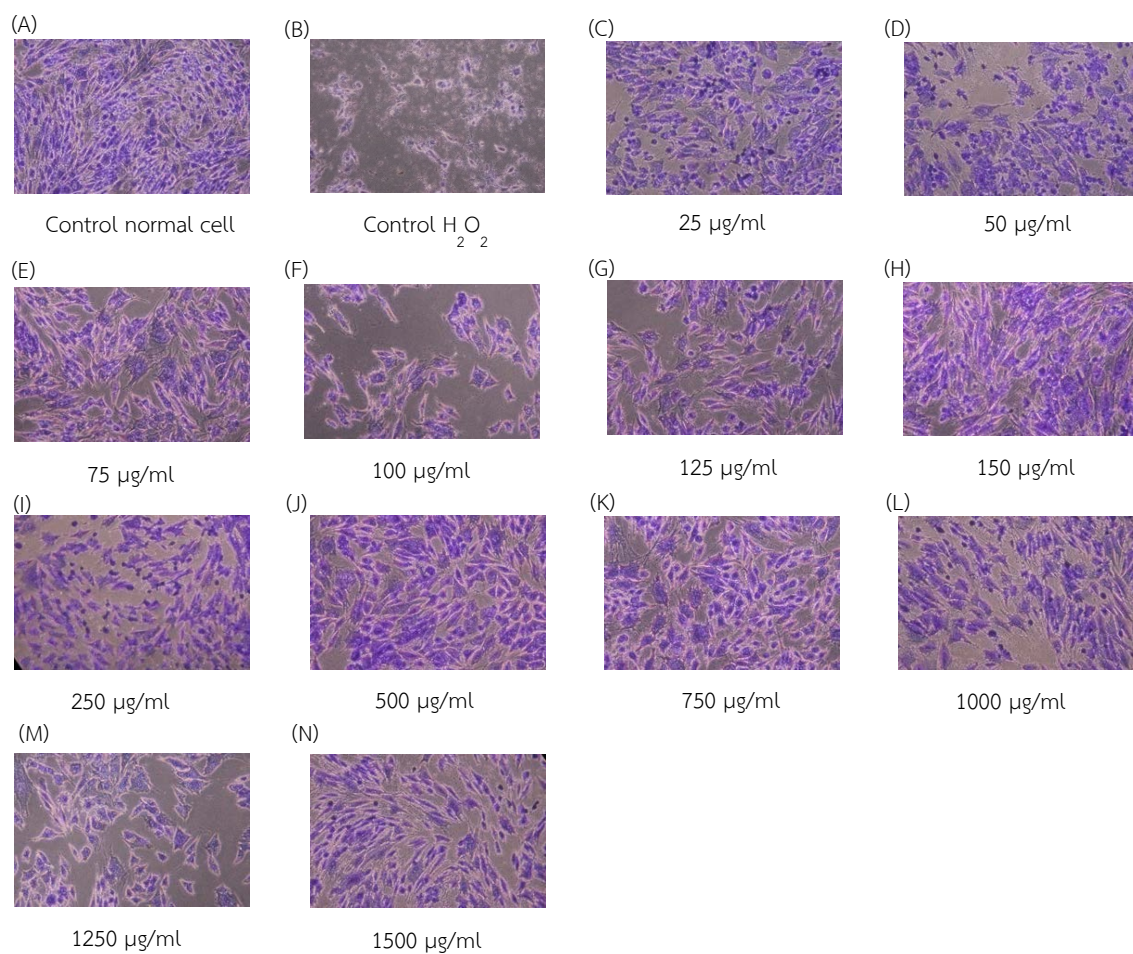
ภาพที่ 5 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อหนูในสารสกัด FT ความเข้มข้น 0 – 1,500 $\mu\text{g/ml}$



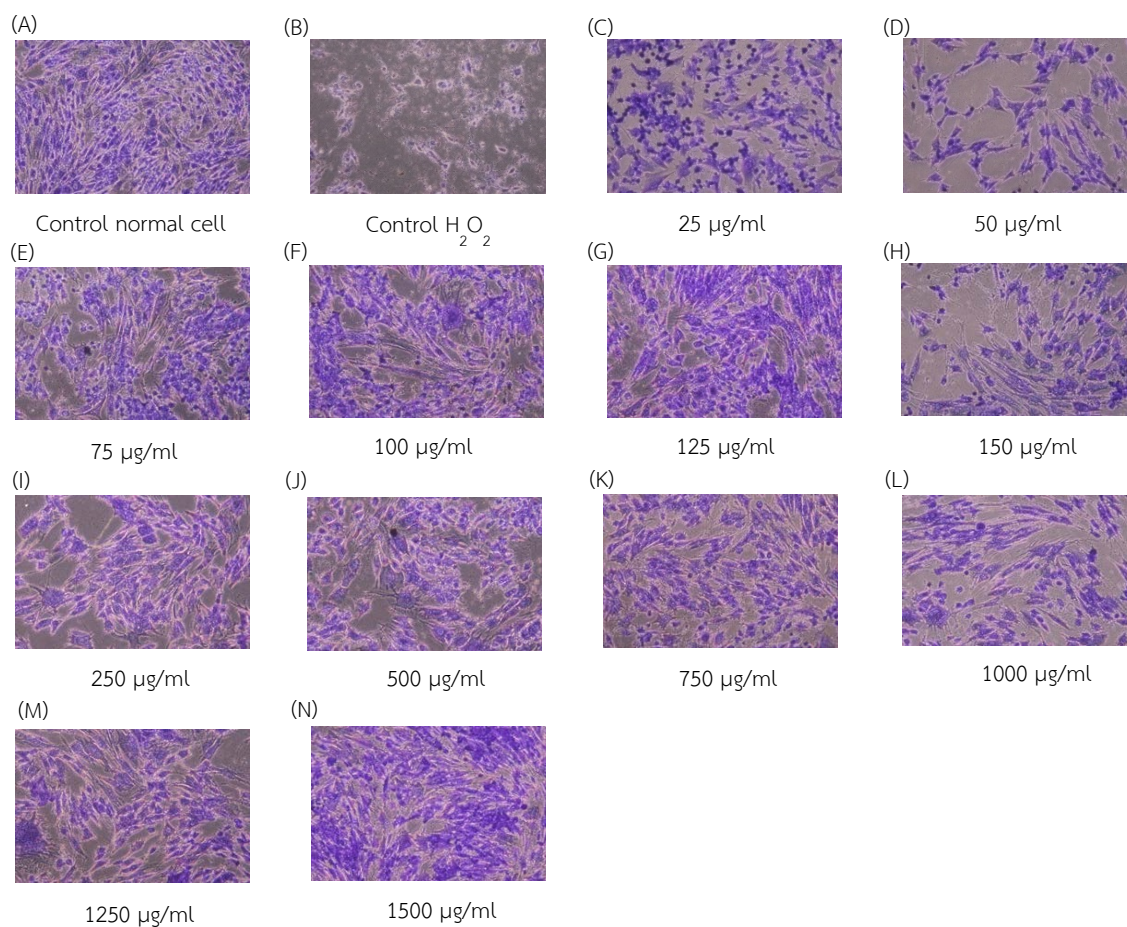
ภาพที่ 6 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อในสารสกัด ASE ความเข้มข้น 0 – 1,500 µg/ml

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปร่า พลาเทนิซิสต่อการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน

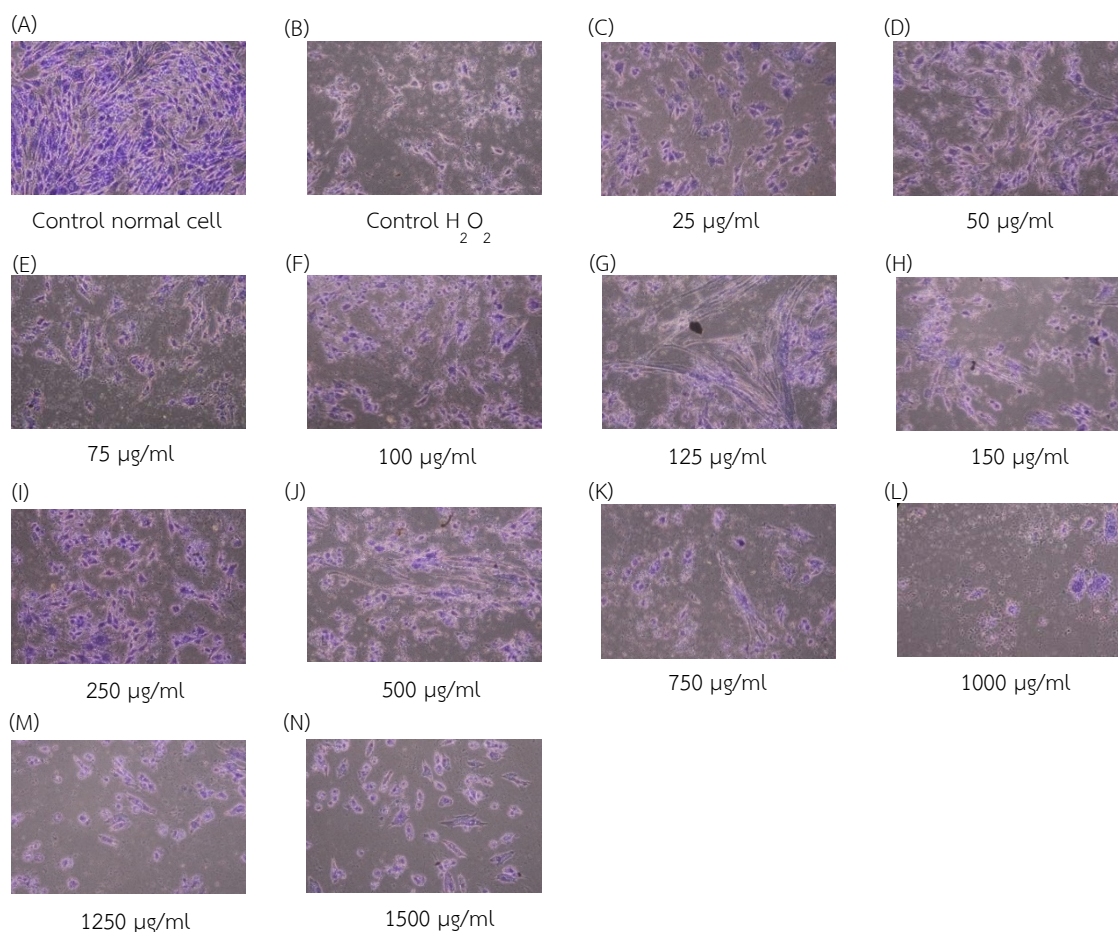
หลังจากเหนี่ยวนำเซลล์กล้ามเนื้อให้เกิดความเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 แล้วจึงทำการผสมสารสกัดทั้ง 3 ชนิดและทำการย้อมเซลล์ด้วย crystal violet assay เพื่อศึกษาการฟื้นฟูเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะของเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเซลล์กล้ามเนื้อหดสั้นลงกว่าเดิมจนมีรูปร่างกลม 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



ภาพที่ 7 เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเลี้ยงด้วย crystal violet ภาพได้กล้องจุลทรรศน์ที่ความขยาย 40x ประกอบด้วย เซลล์ปกติ (A), เซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (B) และเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและได้รับสารสกัด SC ที่ความ 25 – 1,500 µg/ml (C) - (N)



ภาพที่ 8 เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเลี้ยงด้วย crystal violet ภาพได้กล้องจุลทรรศน์ที่ความขยาย 40x ประกอบด้วย เซลล์ปกติ (A), เซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (B) และเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและได้รับสารสกัด FT ที่ความ 25 – 1,500 $\mu g/ml$ (C) - (N)



ภาพที่ 9 เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหุ้มด้วย crystal violet ภาพได้กล้องจุลทรรศน์ที่ความขยาย 40x ประกอบด้วย เซลล์ปกติ (A), เซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (B) และเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและได้รับสารสกัด ASE ที่ความ 25 – 1,500 µg/ml (C) - (N)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดของสารหอยอาร์โรสไปรา พลาเทนิซิสด้วย DPPH assay สารสกัด FT มีเปอร์เซ็นต์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ (% scavenging) สูงสุดที่ 49.9% รองลงมาคือสารสกัด SC และสารสกัด ASE ที่ 33.4% และ 11.9% ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 2,000 µg/ml นอกจากนี้สารสกัด FT มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอีก 2 ชนิด โดยมีค่า LD50 หรือความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตในอัตรา 50% เท่ากับ 1,400 µg/ml ขณะที่ค่า LD50 ของสารสกัด SC และสารสกัด ASE มีค่าเท่ากับ 750 µg/ml และ 800 µg/ml ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบฤทธิ์ในการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน ผลปรากฏว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ในการฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยใช้สารสกัด FT ในปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 75 µg/ml เมื่อเทียบกับสารสกัด SC และสารสกัด ASE ที่ต้องใช้สูงถึง 150 µg/ml และ 125 µg/ml ตามลำดับ

จากการศึกษาของคุณ Alessandra Bosutti และคณะ เซลล์ myoblasts C2C12 ที่ได้จากกล้ามเนื้อโครงร่างของหนูเมาส์ และ myotubes การเปลี่ยนแปลงกล้ามเนื้อโครงร่างและการเผาผลาญออกซิเดชัน โดยใช้ H₂O₂ เป็น

ต้นแบบของความเครียดออกซิเดชันโดยศึกษาสาร resveratrol ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเครียดการเกิดออกซิเดชัน (Bosutti et al., 2015) ซึ่งมีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปรา ปลาเท็นซีสที่ช่วยลดความเครียดที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

สารสกัดสาหร่ายอาร์โธรสไปรา ปลาเท็นซีสที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหาร Zarblue และสกัดด้วยวิธี freeze thaw มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง อีกทั้งมีความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจต่ำ และสามารถฟื้นฟูเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจากการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันแม้ใช้ในปริมาณต่ำ ซึ่งมีศักยภาพในการนำมาเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระและสามารถฟื้นฟูกล้ามเนื้อได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กฤษณ์ ตันตนะรัตน์ และ ดร.สรารุ สัตยาภิ เป็นอย่างสูง ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงสมาชิก CELEB Lab และตลอดจนห้องปฏิบัติการของสถานบริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

- สรารุ สัตยาภิ, ขยพล ศรีพินนาม, อำนาจ เพชรรุ่งนภา, กฤษณ์ ตันตนะรัตน์. กรรมวิธีการผลิตและเพิ่มมวลสารไฟโคไซยานินจากสาหร่ายอาร์โธรสไปรา (*Arthrospira* sp.). กรมทรัพย์สินทางปัญญา ประเทศไทย อนุสิทธิบัตรเลขที่ คำขอ 2003001176. วันยื่นคำขอ 2 มิถุนายน 2563; 2563.
- Bosutti A, Degens H. The impact of resveratrol and hydrogen peroxide on muscle cell plasticity shows a dose-dependent interaction. *Sci Rep* 2015; 5, 8093.
- Fulle S, et al. "The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing." *Experimental Gerontology* 2004; 39(1): 17-24.
- Seo YC, Choi WS, Park JH, Park JO, Jung KH, Lee HY. Stable isolation of phycocyanin from *Spirulina platensis* associated with high-pressure extraction process. *International journal of molecular sciences* 2013; 14(1): 1778-1787.
- Von Haehling S, Morley JE, Anker SD. An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2010; 1(2): 129-133.