



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ”ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเบต้าแอมิลอยด์พลาแกของสารออกฤทธิ์ทาง
ชีวภาพจากน้ำมันหอมระเหยและพืชพื้นเมืองบางชนิดในประเทศไทย
สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์”

**Anti-beta amyloid ($A\beta$) plaques formation of bioactive compounds from
essential oils and some Thai indigenous plant for treatment of Alzheimer's
disease**

โดย ผศ.ดร.กิตติศักดิ์ ศรีภา และคณะ

มิถุนายน 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ”ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเบต้าแอมิลอยด์พลาแกของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก
น้ำมันหอมระเหยและพืชพื้นเมืองบางชนิดในประเทศไทย
สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์”

**Anti-beta amyloid (A β) plaques formation of bioactive compounds from essential
oils and some Thai indigenous plant for treatment of Alzheimer’s disease**

คณะผู้วิจัย

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1. ผศ.ดร. กิตติศักดิ์ ศรีภา | ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. น.ส.สลินทิพย์ จารุสินธนากร | ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. นายสมเจตน์ ไฉนวุฒิ | ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |

ชุดโครงการเครือข่ายวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มมูลค่าพืชพื้นเมืองของไทย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเบต้าแอมิลอยด์พลาสมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำมันหอมระเหยและพืชพื้นเมืองบางชนิดในประเทศไทย สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์” ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยในด้านค่าใช้จ่ายต่างๆของโครงการ และได้รับความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และสาธารณูปโภคต่างๆจาก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล คณะผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวข้างต้นเป็นอย่างสูง

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

มิถุนายน 2555

บทคัดย่อ

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืชพื้นเมืองได้รับความสนใจอย่างมากในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์ โดยเฉพาะการนำมาใช้รักษาโรคความผิดปกติของการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ งานวิจัยชิ้นนี้ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีน A β ของสารกลุ่มน้ำมันหอมระเหยทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสม รวมทั้งสารสกัดจากพืชพื้นเมืองไทยบางชนิด โดยวิธี fluorescence thioflavin T assay จากการศึกษาพบว่าสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว เช่น (-)-carveol γ -terpinene R-(-)- α -phellandrene และ menthol มีฤทธิ์ที่น่าสนใจในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีน A β ค่า IC₅₀ ของสารแต่ละตัวเท่ากับ 12 17 24 และ 27 μ M ตามลำดับ ในกรณีของน้ำมันหอมระเหยแบบผสมและสารสกัดจากพืชพื้นเมืองพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้น และสารสกัดจากผักชีขั้วมีฤทธิ์ดีที่สุดโดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3 μ g/mL และ 5 μ g/mL นอกจากนี้ได้มีการศึกษาแบบจำลองการจับกันระหว่างโมเลกุลของน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวแต่ละตัวกับโปรตีน A β โดยใช้เทคนิค molecular docking ผลการทดลองที่ได้ทำให้ทราบว่าโมเลกุลของน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวชอบจับที่บริเวณ hydrophobic domain ของโปรตีน A β จากข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ได้บอกถึงความมีศักยภาพของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชพื้นเมืองไทยบางชนิด ซึ่งอาจถูกพัฒนาให้เป็นส่วนประกอบที่มีคุณค่าและมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพที่สามารถใช้ป้องกันหรือรักษาโรคได้โดยเฉพาะใช้ในผู้สูงอายุ

Abstract

The interest in bioactive compounds from indigenous plant researches in humans has increased in recent years, especially for the treatment of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease. In this study, the A β aggregation inhibitors of single, mixed essential oils and, extracts of some Thai indigenous plants were evaluated by means of fluorescence thioflavin T assay. Monocyclic structural features of single essential oils such as (-)-Carveol, γ -terpinene, R-(-)- α -phellandrene, and menthol showed attractively high potent A β aggregated inhibitory activities. Their IC₅₀ values are 12, 17, 24, and 27, respectively. In case of mixed essential oils, and , tumeric oils, and extract of *Glinus oppositifolius* exhibited the good activities (IC₅₀ values 3 μ g/mL and 5 μ g/mL). Furthermore, molecular modeling and docking techniques were used to study binding interaction between each molecule of pure essential oil and A β peptides. The results indicated that most molecules of essential oil bind favorably on hydrophobic domain of A β peptides. These obtaining data suggest that these potential essential oils and extract of some Thai indigenous plants might be able to develop as a valuable ingredient with functional properties for nutraceutical food supplements using particular for elderly people.

Executive Summary

วัตถุประสงค์

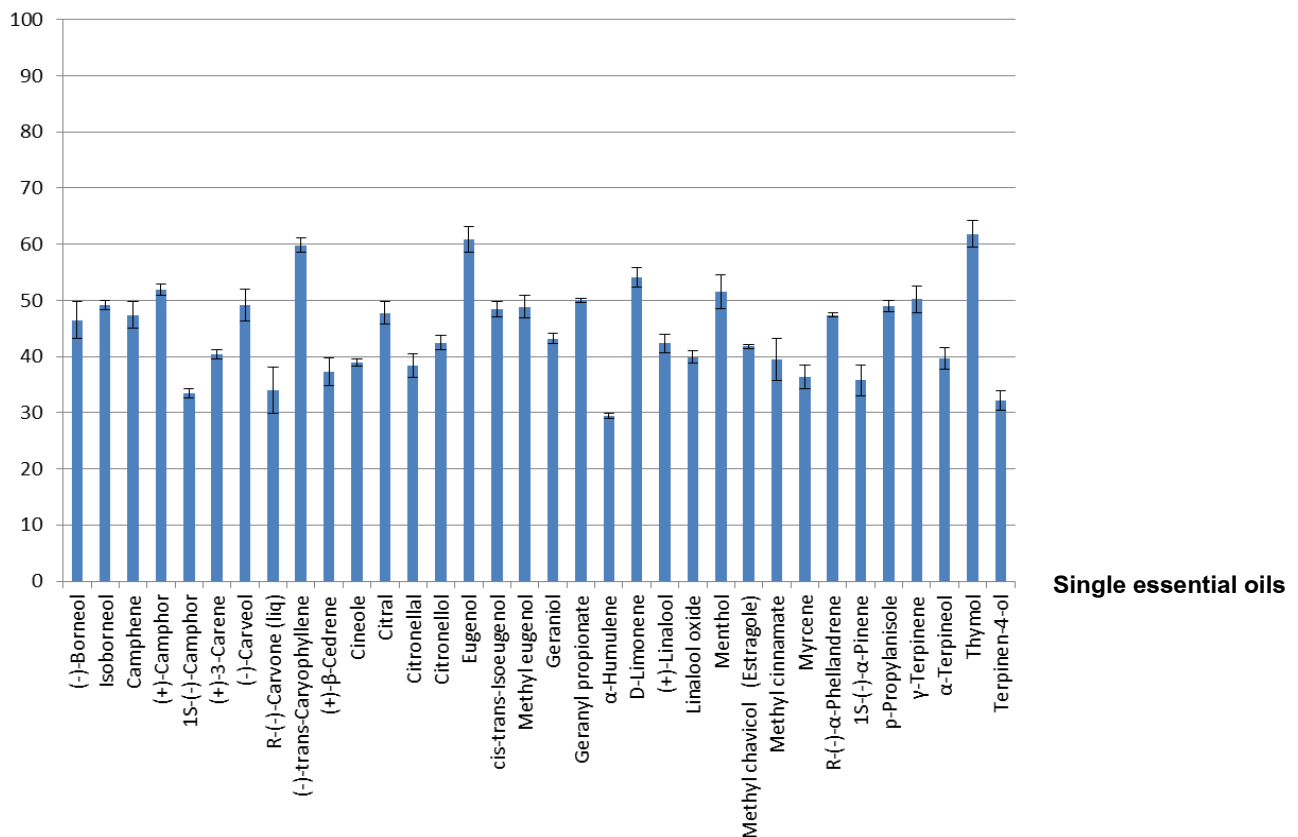
1. ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีน beta-amyloid (A β) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคความจำเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งที่เป็นสารบริสุทธิ์และสารสกัดที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยและพืชพื้นเมืองบางชนิดในประเทศไทยจำนวนไม่น้อยกว่า 40 ชนิด เพื่อเป็นข้อมูลในการส่งเสริมการบริโภคพืชผักพื้นบ้านของไทยและเพิ่มมูลค่าพืชชนิดนั้นๆเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมต่อไป

2. ศึกษาแบบจำลองการเกิด interaction ระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับโปรตีนแอมีลอยด์เบต้าด้วยวิธี molecular docking เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาใหม่ต่อไปในอนาคตโดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นเป็นต้นแบบ

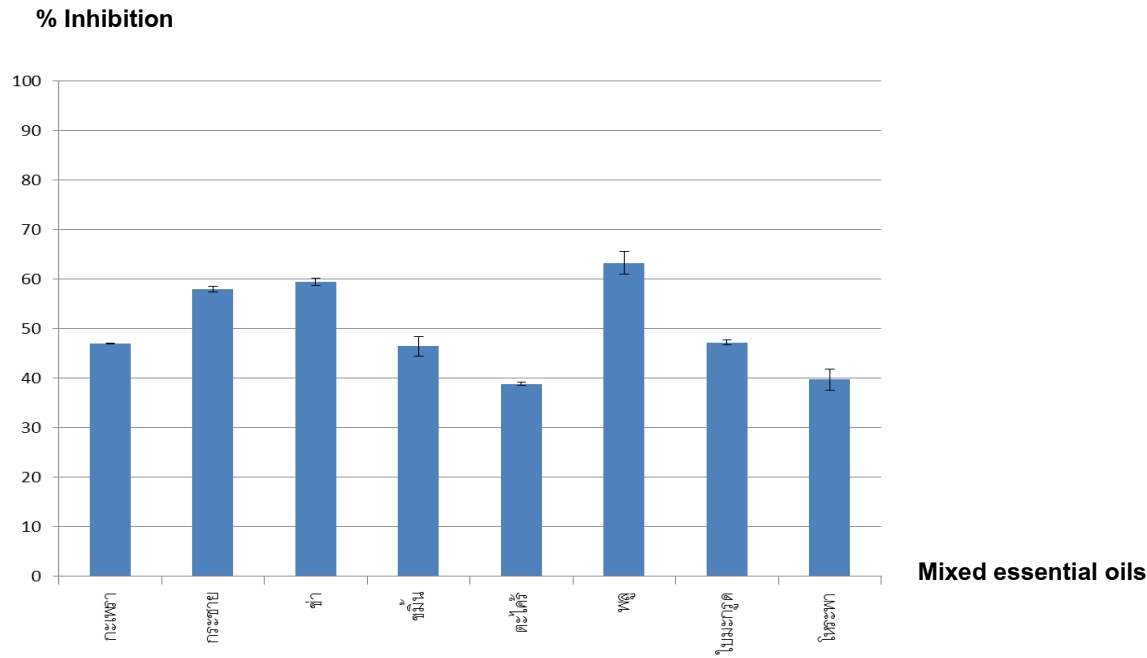
สิ่งที่ได้ดำเนินการและผลที่ได้

1. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีน beta-amyloids (A β) ในหลอดทดลอง ด้วยวิธี fluorescence thioflavin T assay ของสารทดสอบจำนวน 53 ชนิด แบ่งเป็น น้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวจำนวน 34 ชนิด น้ำมันหอมระเหยแบบผสมจำนวน 8 ชนิด และสารสกัดผักพื้นบ้านจำนวน 11 ชนิด จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นที่ความเข้มข้น 100 μ M สำหรับน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว และ 100 μ g/mL สำหรับน้ำมันหอมระเหยแบบผสมและสารสกัดผักพื้นบ้าน ได้ผลแสดงในรูปที่ 1 – 3

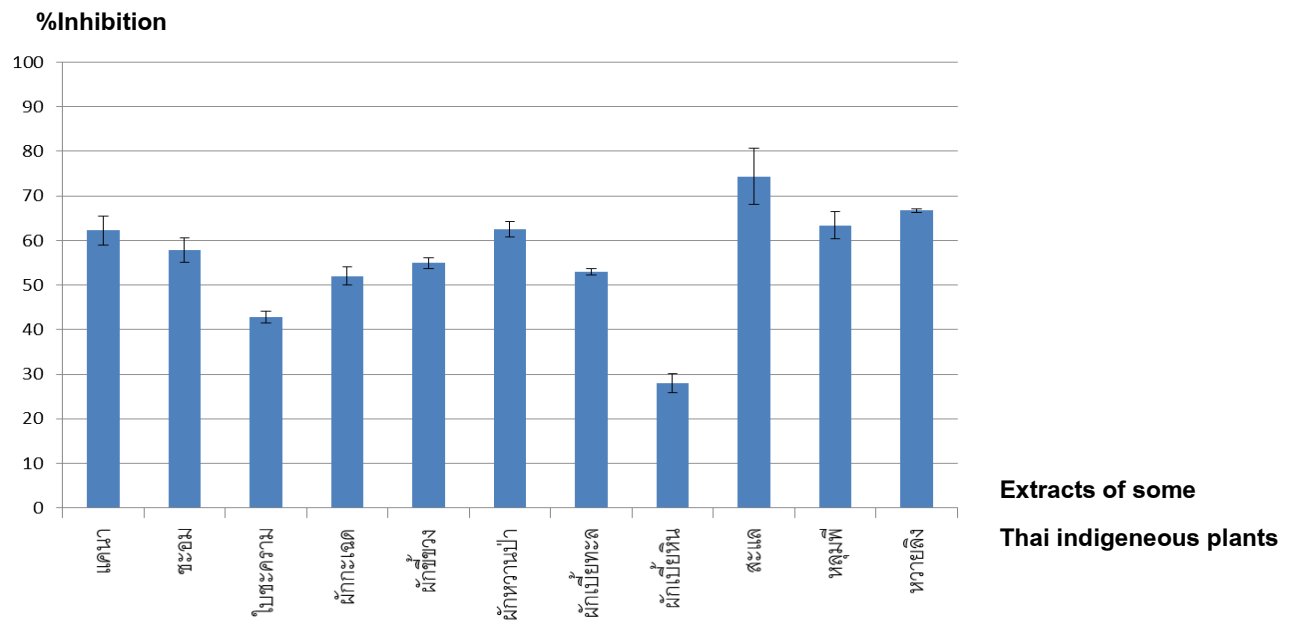
% Inhibition



รูปที่ 1 ค่าการยับยั้งการเกิดการเกาะกลุ่มของ A β ของสารทดสอบน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว จำนวนทั้งหมด 34 ตัว ที่ความเข้มข้น 100 μ M (แสดงค่า %inhibition แบบ mean $\pm$ SD, n = 3)



รูปที่ 2 ค่าการยับยั้งการเกิดการเกาะกลุ่มของ A β ของสารทดสอบน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม จำนวนทั้งหมด 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ (mean $\pm$ SD, n = 3)



รูปที่ 3 ค่าการยับยั้งการเกิดการเกาะกลุ่มของ A β ของสารสกัดของผักพื้นบ้าน จำนวนทั้งหมด 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/mL}$ (mean $\pm$ SD, n = 3)

สารทดสอบบางตัวที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ได้มากกว่า 45% จะถูกเลือกมาหาค่า IC₅₀ ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 32 ชนิด แบ่งเป็น สารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว จำนวน 17 ชนิด ได้แก่ (-)-borneol, isoborneol, camphene, (+)-camphor, (-)-carveol, (-)-trans-caryophyllene, citral, eugenol, cis-trans-isoeugenol, methyl eugenol, geranyl propionate, D-limonene, menthol, R-(-)- α -phellandrene, *p*-propylanisole, γ -terpinene, thymol สารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบผสม จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ กระ

เพรา กระชาย ข่า ขมิ้น พลู ใบมะกรูด และสารทดสอบที่เป็นสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ แคนา ชะอม ผักกะเจด ผักชีขวง ผักหวานป่า ผักเบี้ยทะเล สะแล หลุมพี หวายลิง ตารางที่ 1 แสดงค่า IC_{50} ของสารทดสอบทั้ง 32 ชนิด

ตารางที่ 1 แสดงค่า IC_{50} การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ของสารทดสอบ จำนวน 32 ชนิด

สารทดสอบ	IC_{50} (μ M)	สารทดสอบ	IC_{50} (μ g/ml)
(-)-borneol	279	กระเพรา	39
isoborneol	286	กระชาย	10
camphene	47	ข่า	28
(+)-camphor	513	ขมิ้น	3
(-)-carveol	12	พลู	80
(-)-trans-caryophyllene	228	ใบมะกรูด	429
citral	35	แคนา	40
eugenol	770	ชะอม	242
cis-trans-isoeugenol	329	ผักกะเจด	163
methyl eugenol	33	ผักชีขวง	5
geranyl propionate	1386	ผักหวานป่า	63
D-limonene	203	ผักเบี้ยทะเล	97
menthol	27	สะแล	15
R-(-)- α -phellandrene	24	หลุมพี	45
p-propylanisole	413	หวายลิง	21
γ -terpinene	17	Curcumin*	0.77
thymol	100		

*Positive control

สารที่มีฤทธิ์ที่สูงสุดในแต่ละกลุ่มมีดังนี้ (-)-carveol เป็นสารที่มีฤทธิ์ที่สูงสุดในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว น้ำมันจากขมิ้น เป็นสารที่มีฤทธิ์ที่สูงสุดในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยแบบผสม สารสกัดจากผักชีขวง เป็นสารที่มีฤทธิ์ที่สูงสุดในกลุ่มสารสกัดพืชพื้นบ้าน โดยมีค่า IC_{50} ตามลำดับ ดังนี้ 12 μ M, 3 μ g/mL และ 5 μ g/mL

2. การศึกษาแบบจำลองการเกิด interaction ระหว่างน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวทั้ง 34 ชนิด กับ A β_{42} โดยใช้ molecular docking พบว่าค่า binding energy ของสารทดสอบอยู่ในช่วง -3.15 - -5.13 kcal/mol ซึ่งยังคงมีค่าสูงกว่า cucurmin ซึ่งมีค่า binding energy เท่ากับ -5.87 kcal/mol สารทดสอบส่วนใหญ่จะจับที่บริเวณ hydrophobic domain ของกรดอะมิโนลำดับที่ 10 – 19

จากการศึกษาในงานวิจัยชิ้นนี้พบว่า มีสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยบางตัวทั้งที่เป็นแบบเดี่ยวและผสม สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ได้ เช่นเดียวกับสารสกัดจากพืชพื้นบ้านบางชนิด จึงเป็นแนวโน้มที่ดีที่จะพัฒนาสารเหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาการปกป้อง neuronal cell จากความเป็นพิษที่ถูกกระตุ้นโดย A β รวมทั้งการศึกษาใน *in vivo* เพื่อยืนยันฤทธิ์ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาโมเลกุลของยาตัวใหม่เพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ได้ต่อไปในอนาคต

สัญญาเลขที่ RDG5420021

โครงการ: ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเบต้าแอมิลอยด์พลาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำมันหอมระเหยและพืชพื้นเมืองบางชนิดในประเทศไทยสำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์

สรุปรายงานฉบับสมบูรณ์

ส่วนที่ 1 ข้อมูลโครงการ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : ผศ.ดร.กิตติศักดิ์ ศรีภา

โครงการเริ่มเมื่อวันที่ 1 เมษายน 2554 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2555 รวมเวลาทำวิจัยทั้งสิ้น 16 เดือน

ส่วนที่ 2 รายงานเนื้อหา

โครงการนี้เป็นโครงการขยายจากชุดเครือข่ายวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มมูลค่าพืชพื้นเมืองของไทย เป็นโครงการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าแอมิลอยด์ของสารสำคัญทางชีวภาพที่ได้จากน้ำมันหอมระเหย และพืชพื้นเมืองของไทย ทั้งนี้การเกาะกลุ่มดังกล่าวเป็นสาเหตุสำคัญของโรคความจำเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งที่เป็นสารบริสุทธิ์และสารสกัดที่ค้นพบ ทั้งที่มีการเผยแพร่ข้อมูลและที่ยังไม่ได้เผยแพร่ข้อมูลจากพืชเครื่องเทศ และพืชอาหารภาคเหนือและในป่าชายเลนไม่น้อยกว่า 40 ตัว จะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีนเบต้าแอมิลอยด์ด้วยวิธี Thioflavin T assay นอกจากนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลในระดับโมเลกุล สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำมาทดสอบจะถูกนำมาสร้างแบบจำลองโมเลกุลของการเกิด interaction ระหว่างสารนั้นกับโปรตีนแอมิลอยด์เบต้า งานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์ต่อทั้งบุคคลทั่วไปที่จะได้ทราบข้อมูลฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีนแอมิลอยด์เบต้าที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหย และพืชพื้นเมืองของไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการบริโภคเพื่อใช้รักษาหรือป้องกันโรคความจำเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์ เป็นประโยชน์ต่อผู้ประกอบการที่สามารถนำข้อมูลจากงานวิจัยนี้ไปพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อใช้รักษาหรือป้องกันโรคความจำเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์ โดยใช้วัตถุดิบจากพืชพื้นเมือง ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบภายในประเทศ และเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยที่สามารถนำข้อมูลจากงานวิจัยชิ้นนี้ไปพัฒนาโครงสร้างทางเคมีโดยใช้โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นต้นแบบเพื่อออกแบบยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีนแอมิลอยด์เบต้า เพื่อพัฒนาต่อไปเป็นยารักษาโรคความจำเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์

1. หลักการและเหตุผล

ในปัจจุบันพบว่าอัตราการเสื่อมสภาพทางด้านความจำ ในช่วงอายุมากกว่า 50 ปี เพิ่มขึ้นโดยมีความสัมพันธ์แบบ exponential ซึ่งโรคอัลไซเมอร์นั้นเป็นหนึ่งในโรคที่ทำให้เกิดอาการความจำเสื่อมที่สำคัญ จากการวิจัยและคาดคะเนของ Canadian Study of Health and Aging พบว่าจะมีจำนวนผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในประเทศกำลังพัฒนาเพิ่มมากขึ้นจาก 13.5 ล้านคน ในปีค.ศ.2000 เป็น 21.2 ล้านคนในปีค.ศ.2025 และเพิ่มเป็น 36.7 ล้านคนในปีค.ศ.2050 และยังพบว่าผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีอัตราการเสียชีวิตระดับเดียวกับโรคหลอดเลือดในสมองแตก (stroke) อีกด้วย [1] จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ภาระค่ารักษาพยาบาลโรคนี้ในผู้สูงอายุเพิ่มมากขึ้น แนวทางในการลดค่ารักษาพยาบาลคือการดูแลสุขภาพให้แข็งแรง และรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ โครงการวิจัยนี้จึงได้ศึกษาคุณสมบัติของพืชพื้นเมืองที่นอกเหนือจากคุณค่าทางอาหาร เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการ

รับประทานพืชผักที่เป็นประโยชน์ และทำให้เกิดแนวทางในการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางเกษตรโดยทำเป็นผลิตภัณฑ์ทั้งในระดับชุมชนและอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์แก่นักวิจัยในการพัฒนายาใหม่โดยใช้สารสำคัญทางชีวภาพเป็นต้นแบบอีกด้วย

เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น มีพืชผักที่รับประทานได้อยู่มากหลาย พืชแต่ละชนิดจะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นส่วนประกอบแตกต่างกันไป ปัจจุบันพบรายงานน้อยมากเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีน แอมิลอยด์เบต้าของสารสำคัญทางชีวภาพที่เป็นส่วนประกอบในพืชผักของไทย ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ และเป็นโอกาสอันดีที่จะศึกษาฤทธิ์นี้ ในการศึกษาครั้งนี้จะเน้นสารสำคัญจากพืชที่หาง่ายในกลุ่ม เครื่องเทศ พืชอาหารในภาคเหนือและป่าชายเลน ตัวอย่างเช่น พืชที่มีส่วนประกอบเป็นน้ำมันหอมระเหย เช่น กะเพรา ตะไคร้ โหระพา กระชาย มะกรูด พืชผักพื้นบ้านทางเหนือและป่าชายเลน เช่น ชะมวง ผักเบี้ยทะเล ชะคราม หนามแดง หวายลิง ตานหม่อน ผักหนาม แพงพวย ผักปลาบ พืชบางชนิดมีการศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญบ้างแล้ว เช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย สารสำคัญ α -citral (geranial) และ β -citral (neral) และ mycrene ที่พบในน้ำมันตะไคร้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* [2,3] และยังมีฤทธิ์ต้าน *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร [4] ต้านเชื้อ entero pathogens ได้แก่ *Salmonella* spp., *E. coli*, *Compylobacter jejunii* และ *Clostridium perferingens* [5] สาร thymol, cavacrol, salicylaldehyde [6] ที่พบในน้ำมันโหระพามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดคือ *Propionibacterium acnes* [7] *Enterococcus faecium*, *Salmonella cholerasuis* [8] *Staphylococcus aureus* [8,9] *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus* [9] เชื้อ EIEC 240-1 (enterovasive *E. coli*) และ STEC 0157 [10] เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารสกัด methanol ของใบชะมวง [11] สารสกัด acetone ของใบผักเบี้ยทะเล [12] สารสกัด ethanol ของหนามแดง เป็นต้น

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นโรคที่มีการดำเนินอย่างช้าๆตลอดเวลาส่งผลให้ความสามารถในการจดจำ และการเรียนรู้เรื่องต่างๆ ลดลง ดังนั้นจึงมีผลกระทบอย่างมากต่อการใช้ชีวิตประจำวัน เช่น นึกคำพูดไม่ออก บวกลบเลขง่ายๆไม่ได้ สิ่งของที่ตัวเองทำเป็นประจำในแต่ละวัน มีพฤติกรรมเปลี่ยนไปจากเดิม เป็นต้น พยาธิสภาพหลักของโรคอัลไซเมอร์ที่พบมี 2 สาเหตุคือ เกิดจากการรวมตัวกันของ amyloid plaques และ neurofibrillary tangles (NTFs) ในสมอง [13] โดยที่ amyloid plaques เกิดจากการรวมตัวกันของ beta-amyloid peptide ($A\beta$) ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 40 และ/หรือ 42 ($A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$) ตามลำดับ ซึ่ง $A\beta_{42}$ จะมีความเป็นพิษที่สูงกว่า $A\beta_{40}$ ส่วน NTFs เกิดจากการเติม phosphate ลงใน tau protein มากเกินไป [14] จากเหตุการณ์ทั้งสองอย่างทำให้เส้นประสาทเกิดการอักเสบ และเกิดการตายในที่สุด ดังนั้นจึงปรากฏอาการผิดปกติทางสมองที่เกี่ยวข้องกับความจำ และการเรียนรู้ต่างๆ

ตามปกติ amyloid precursor protein (APP) ที่อยู่ในสมองเป็นตัวสร้าง $A\beta$ ผ่าน 2 กลไกคือ non-amyloidogenic- และ amyloidogenic pathway กลไกแบบ non-amyloidogenic pathway จะใช้เอนไซม์ α - และ γ secretase ทำให้ได้ $A\beta$ ที่มีขนาดเล็ก (soluble $A\beta$ protein) ซึ่งไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของ $A\beta$ ในขณะที่ amyloidogenic pathway จะใช้เอนไซม์ β - และ γ -secretase ทำให้ได้ $A\beta$ ที่มีขนาดใหญ่ (non-soluble $A\beta$ protein) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของ $A\beta$ และพัฒนาต่อไปเป็นพลาแกตามลำดับ

ในปัจจุบันมีการพัฒนาและคิดค้นสารเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคความจำเสื่อมซึ่งมีอยู่หลายกลุ่ม ขึ้นอยู่กับสมมติฐานของกลไกการเกิดโรค เช่น

กลุ่มที่ 1 Acetylcholine esterase inhibitor (AChEI) เป็นที่ทราบกันดีว่า acetylcholine (ACh) เมื่อจับกับ muscarinic type 1 receptor จะกระตุ้นกระบวนการเรียนรู้และความจำขึ้น จึงมีการผลิตยาขึ้นมาเพื่อที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholine esterase (AChE) ที่ใช้ในการทำลาย ACh [15]

กลุ่มที่ 2 Anti-inflammatory agents เนื่องจากการอักเสบของ neuron จะส่งผลให้เกิดการบวม และรบกวนการทำงานของเซลล์ประสาท เช่นการส่งผ่านสัญญาณ และสุดท้ายส่งผลให้เซลล์ตายได้ จึงมีแนวคิดที่จะใช้ยาในกลุ่มนี้เพื่อที่จะลดการอักเสบของเซลล์ประสาท [16]

กลุ่มที่ 3 Antioxidant เนื่องจากการพบภาวะ oxidative stress (ภาวะที่มีปริมาณของ oxidants มากกว่าปกติ) เป็นสาเหตุทำให้เซลล์ประสาทถูกทำลาย เพื่อที่จะลดสาเหตุดังกล่าวจึงมีแนวคิดที่จะนำสาร antioxidants ต่างๆมาใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ [17]

กลุ่มที่ 4 β -Secretase และกลุ่ม γ -secretase inhibitors เนื่องจาก $A\beta_{42}$ ซึ่งจัดเป็น non-soluble $A\beta$ เกิดจากการตัด APP ด้วยเอนไซม์ β - และ γ -secretase ตามลำดับ ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองตัวนี้จะส่งผลให้ปริมาณการเกิด $A\beta_{42}$ ลดลงได้ [18] แต่พบว่ายากลุ่ม γ -secretase inhibitors จะมีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายเนื่องจากเอนไซม์ γ -secretase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการตัด substrate หลายชนิดในร่างกาย เช่น Notch, CD_{44} เป็นต้น เมื่อทำการยับยั้ง จะส่งผลให้ substrate เหล่านี้ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ตัวอย่างเช่น Notch เมื่อถูกตัดโดยเอนไซม์ γ -secretase จะได้ notch intracellular domain (NICD) ที่มีฤทธิ์ต่อการเกิด cell differentiation ของเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือด ดังนั้นเมื่อทำการยับยั้งเอนไซม์ ทำให้ไม่เกิด NICD ร่างกายจึงเป็นอันตรายได้ [19] จึงมีการพัฒนายาขึ้นใหม่เป็นกลุ่ม γ -secretase modulators

กลุ่มที่ 5 γ -Secretase modulators ยากลุ่มนี้มีแนวคิดมาจากความต้องการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ γ -secretase ให้ผิดปกติแต่ไม่ยับยั้ง ส่งผลให้ APP สร้างแต่ soluble $A\beta$ และไม่ยับยั้งการตัด substrate อื่นๆ ทั้งนี้เพื่อต้องการลดอาการข้างเคียงข้างต้นได้ [20]

กลุ่มที่ 6 Anti- $A\beta$ aggregation จากที่ทราบกันมาแล้วว่าการเกาะกลุ่มของ $A\beta$ และพัฒนาต่อไปจนเกิดเป็น amyloid plaque และมีการสะสมที่เส้นประสาทจะทำให้เซลล์ประสาทเกิดการอักเสบ จึงมีแนวคิดที่จะนำสารมาจับกับ $A\beta$ เพื่อยับยั้งไม่ให้เกิดการรวมตัวของ $A\beta$ และพัฒนาต่อไปจนเป็น plaque เพื่อใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ [21]

สารในกลุ่มที่ 1 ถึง 3 เป็นสารที่ถูกพัฒนาในช่วงต้นเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคความจำเสื่อมโดยเฉพาะสารในกลุ่มที่ 1 ซึ่งปัจจุบันใช้เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ เช่น donepezil และ rivastigmine เป็นต้น แต่การรักษาตามสมมติฐานของการเกิดโรคของสารในกลุ่มที่ 1 ถึง 3 เป็นการรักษาที่ปลายเหตุ ทำให้ผลการรักษายังเป็นที่ไม่น่าพอใจ ในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นการพัฒนาในกลุ่มที่ 3 ถึง 6 ซึ่งเป็นการรักษาที่สาเหตุหลัก โดยเฉพาะกลุ่ม Anti- $A\beta$ aggregation เป็นกลุ่มที่น่าสนใจในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ ทั้งนี้เพราะสารในกลุ่มนี้เป็นสารโมเลกุลเล็กและยังไม่มีผลข้างเคียงเหมือนกลุ่ม γ -secretase inhibitors อีกด้วย ปัจจุบันยา tramiprosate ซึ่งกำลังศึกษาอยู่ในขั้น clinical trial phase III จัดเป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ $A\beta$ [22]

การทดสอบฤทธิ์ anti- $A\beta$ aggregation จะใช้วิธี thioflavin T assay โดยใช้สาร thioflavin T ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม benzothiazole เป็นตัว marker สารตัวนี้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยการเกิด amyloid plaques ทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* [23] โดยใช้หลักการเรืองแสง fluorescence ของ complex ที่เกิดขึ้นระหว่าง amyloid plaques และ thioflavin T ตามปกติ thioflavin T สามารถเกิด complex กับ amyloid plaques และเกิดการเรืองแสง

fluorescence โดยให้ค่า emission และ excitation ที่ความยาวคลื่นเฉพาะเจาะจง ถ้าสารที่เรานำมาทดสอบสามารถยับยั้งการเกิด amyloid plaques จะทำให้การเกิด complex ระหว่าง thioflavin T และ amyloid plaques ลดลง ส่งผลต่อค่าการเรืองแสง fluorescence ซึ่งสามารถนำมาใช้คำนวณหาค่า % inhibition และ IC_{50} ได้ต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีน beta-amyloid ($A\beta$) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคความจำเสื่อมชนิดอัลไซเมอร์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งที่เป็นสารบริสุทธิ์และสารสกัดที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยและพืชพื้นเมืองบางชนิดในประเทศไทยจำนวนไม่น้อยกว่า 40 ชนิด เพื่อเป็นข้อมูลในการส่งเสริมการบริโภคพืชผักพื้นบ้านของไทยและเพิ่มมูลค่าพืชชนิดนั้นๆเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมต่อไป

2.2 ศึกษาแบบจำลองการเกิด interaction ระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับโปรตีนแอมิลอยด์เบต้าด้วยวิธี molecular docking เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาใหม่ต่อไปในอนาคตโดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นเป็นต้นแบบ

3. การดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีและเครื่องมือ	บริษัทผลิต	ประเทศ
Thioflavin T	Sigma-Aldrich	USA
Trizma base 99.9%	Sigma-Aldrich	USA
Sodium hydroxide	Carlo Erba	France
Dimethylsulfoxide	Merck	Germany
Beta-amyloid peptide	American peptide company, Inc.	USA
96-well plates	Thermo Fischer Scientific	Denmark
Micropipette	Thermo Fischer Scientific	Finland
Microplate reader fluorescence	Molecular devices	USA

3.2 สารทดสอบที่ดำเนินการวิจัย

สารทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ น้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว (single volatile oils) จำนวน 34 ชนิด น้ำมันหอมระเหยแบบผสม (mixed volatile oils) จำนวน 8 ชนิด และ สารสกัดผักพื้นบ้าน จำนวน 11 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2

3.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ $A\beta$ ด้วยวิธี thioflavin T assay [23-26]

3.3.1 การเตรียม reagents สาร positive control และสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ

3.3.1.1 การเตรียม 50mM Tris-HCl buffer pH 7.4

ชั่ง Tris-HCl จำนวน 1.5142 g ละลายในน้ำ 250 mL จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วย 0.1 N HCl

3.3.1.2 การเตรียมสารละลาย thioflavin T (freshly prepare)

เตรียมสารละลาย thioflavin T ความเข้มข้น 3.14 mM ในน้ำ จากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ ปริมาตร 40 μ L ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL ปรับปริมาตรด้วย Tris buffer ความเข้มข้น 50 mM pH 7.4

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนสารทดสอบที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สารทดสอบ		รายชื่อ			
น้ำมันหอมระเหย แบบเดี่ยว (34 ชนิด)		(-)-Borneol	(-)-Carveol	(-)-trans-Caryophyllene	
		(+)-3-Carene	(+)-Camphor	(+) -Linalool	
		(+)-β-Cedrene	1S-(-)-Camphor	1S-(-)-α-Pinene	
		Camphene	Cineole	cis-trans-Isoeugenol	
		Citral	Citronellal	Citronellol	
		D-Limonene	Eugenol	Geraniol	
		Geranyl propionate	Isoborneol	Linalool oxide	
		Menthol	Methyl chavicol (Estragole)		
		Methyl cinnamate	Methyl eugenol	Myrcene	
		p-Propylanisole	R-(-)-Carvone (liq)	R-(-)-α-Phellandrene	
		Terpinen-4-ol	Thymol	α-Humulene	
	α-Terpineol	γ-Terpinene			
น้ำมันหอมระเหย แบบผสม (8 ชนิด)	กะเพรา	กระชาย	ข่า	ขมิ้น	ตะไคร้
	พลู	ใบมะกรูด	โหระพา		
สารสกัดผักพื้นบ้าน* (11 ชนิด)	แคนา	ชะอม	ใบชะคราม	ผักกะเจต	ผักชีฝรั่ง
	ผักหวานป่า	ผักเบี้ยทะเล	ผักเบี้ยหิน	สะแล	หลุมพี
	หาวายลิง				

*หมายเหตุ: พืชพื้นบ้านสกัดด้วย 70%MeOH โดยวิธี maceration เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 3 ครั้ง

3.3.1.3 การเตรียมสารละลาย A β

เตรียมสารละลาย A β ในสารละลาย 10 mM NaOH ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 mg/mL จากนั้นเปิดสารละลาย A β ที่เตรียมได้ปริมาตร 216.4 μ L ลงหลอด eppendorf เติมสารละลาย Tris บัฟเฟอร์ปริมาตร 738.6 μ L จะได้สารละลาย stock ของ A β ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 25 μ M

3.3.1.4 การเตรียม stock solution ของ positive control (curcumin) และสารทดสอบน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว น้ำมันหอมระเหยแบบผสม และสารสกัดผักพื้นบ้าน

1. ชั่ง curcumin และละลายใน DMSO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 mM จากนั้นเจือจางด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 mg/mL

2. ชั่งน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและละลายใน DMSO เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 100 mM

3. ชั่งน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมและละลายใน DMSO เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 20 mg/mL

4. ชั่งสารสกัดพืชพื้นบ้านและละลายใน tween 20 จำนวน 0.1 mL จากนั้นเจือจางและปรับปริมาตรให้เป็น 10 mL เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 20 mg/mL จากนั้นผสมและละลายใน ultrasonic bath จนกระทั่งสารสกัดละลายหมด จึงนำไปกรองด้วย nylon filter ขนาด 0.45 μ m

3.3.1.5 การเตรียมสารละลายสำหรับการทดสอบเบื้องต้น (screening test)

1. น้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว

เจือจางสารละลาย stock solution (100 mM) ของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดียวด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 mM

2. น้ำมันหอมระเหยแบบผสม

เจือจางสารละลาย stock solution (20 mg/mL) ของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/mL

3. สารสกัดพืชพื้นบ้าน

เจือจางสารละลาย stock solution (20 mg/mL) ของสารสกัดผักพื้นบ้านด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/mL

3.3.1.6 การเตรียมสารละลายสำหรับการทดสอบหาค่า IC_{50}

สารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว ที่ต้องการหาค่า IC_{50} จะเตรียมให้อยู่ในรูปสารละลายจำนวน 5 ความเข้มข้น ในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 100 mM สำหรับสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบผสม และที่เป็นสารสกัดผักพื้นบ้านจะเตรียมให้อยู่ในรูปสารละลายจำนวน 6 ความเข้มข้น ในช่วงความเข้มข้น 0.001 – 10 mg/mL ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของสารทดสอบก่อนเปิดลง plate สำหรับหาค่า IC_{50}

สารละลายของ สารทดสอบ	ความเข้มข้นสาร ทดสอบที่เป็นน้ำมัน หอมระเหยแบบเดี่ยว	ความเข้มข้นสารทดสอบที่เป็นน้ำมัน หอมระเหยแบบผสมและที่เป็นสารสกัด ผักพื้นบ้าน
	(mM)	(mg/mL)
1	100	10
2	10	5
3	1	1
4	0.1	0.1
5	0.01	0.01
6	-	0.001

3.3.2 ขั้นตอนการทดสอบ

3.3.2.1 เปิดสารละลาย A β จำนวน 9 μ L และ 1 μ L ของ DMSO ลงใน 96 wells plate เขย่าให้เข้ากันปิดด้วยฝาครอบ plate นำไป incubate ที่ 37 °C ในที่มีดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การทำในข้อนี้จัดเป็น free aggregation ของ A β (F $_{A\beta}$)

3.3.2.2 เปิดสารละลายที่เป็น positive control สารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวและแบบผสม รวมทั้งสารละลายสารสกัดผักพื้นบ้าน (F $_s$) ปริมาตรอย่างละ 1 μ L ลงในแต่ละหลุมของ 96 wells plate เติมสารละลาย A β จำนวน 9 μ L สำหรับ sample blank (F $_{sb}$) ประกอบด้วย สารละลาย positive control หรือสารละลายของสารทดสอบปริมาตร 1 μ L Tris บัฟเฟอร์ปริมาตร 9 μ L สำหรับ reagent blank (F $_{rb}$) ประกอบด้วย DMSO ปริมาตร 1 μ L Tris บัฟเฟอร์ปริมาตร 9 μ L การทดสอบสารทุกตัว รวมทั้งสาร control และ blank ทุกชนิดให้ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ หลังจากเปิดสารลงใน plate ตามกลุ่มต่างๆเรียบร้อยแล้ว เขย่าให้เข้ากันปิดด้วยฝาครอบ

plate นำไป incubate ที่ 37 °C ในที่มีดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบที่ใช้หาค่า IC₅₀ มีค่าดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบสำหรับหาค่า IC₅₀

สารละลายของ สารทดสอบ	ความเข้มข้นสาร ทดสอบที่เป็นน้ำมัน หอมระเหยแบบเดี่ยว	ความเข้มข้นสารทดสอบที่เป็นน้ำมัน หอมระเหยแบบผสมและที่เป็นสารสกัด ผักพื้นบ้าน
	(mM)	(mg/mL)
1	10	1
2	1	0.5
3	0.1	0.1
4	0.01	0.01
5	0.001	0.001
6	-	0.0001

เมื่อครบตามกำหนดเวลา 96 well plates ที่เตรียมในข้อ 3.3.2.1 และ 3.3.2.2 ให้เติม 200 µL ของสารละลาย Thioflavin T ที่มีความเข้มข้น 5 µM และวัดค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ความยาวคลื่น excitation ที่ 446 nm และ emission ที่ 500 nm การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ Aβ สามารถคำนวณได้ดังสมการที่ 1

$$\% \text{ Inhibition} = \left[1 - \frac{(F_s - F_{sb})}{(F_{A\beta} - F_{rb})} \right] \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

โดยที่

F_s = ค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

F_{sb} = ค่าการดูดกลืนแสงของ sample blank

F_{Aβ} = ค่าการดูดกลืนแสงของ free aggregation control

F_{rb} = ค่าการดูดกลืนแสงของ reagent blank

สำหรับค่า IC₅₀ สามารถหาได้จากการคำนวณโดยใช้โปรแกรม prism version 4.0 ซึ่งเป็นการ plot ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ Aβ และ ค่า log ของความเข้มข้น

3.4 การศึกษา binding interaction ด้วย molecular docking

3.4.1 การวาดโครงสร้างของสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวทั้ง 34 ตัว และ curcumin ที่เป็น positive control โดยใช้โปรแกรม Sybyl version 8.1 หลังจากทำให้เป็นโครงสร้างทางเคมีแบบ 3 มิติ ทำการปรับ conformation ให้มีพลังงานต่ำสุด โดยใช้คำสั่ง Gasteiger-Huckel และตั้งค่า gradient ไว้ที่ 0.05 kcal/mol

3.4.2 การเตรียม Aβ target ทำได้โดย download Aβ₁₋₄₂ (PDB code: 1Z0Q) จาก protein data bank ทำการเติมไฮโดรเจนและประจุแบบ Gasteiger charge และเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแบบไฟล์ที่มีนามสกุลเป็น pdbqt ตามลำดับ ทั้งหมดนี้ทำได้โดยใช้โปรแกรม Autodock version 4.0

3.4.3 การทำ validation ของ Autodock parameter

ก่อนที่จะทำ docking เพื่อศึกษาการเกิด interaction ของสารแต่ละตัวกับ AB_{1-42} จำเป็นจะต้องหาค่า parameter ที่เหมาะสม ซึ่งทำได้โดยตั้งค่า grid parameter ให้ครอบคลุมทั้งสารทดสอบและ AB_{1-42} ซึ่งในที่นี้จะใช้ curcumin ซึ่งเป็น positive control เป็นตัวแทน และหาค่า docking parameter ที่เหมาะสม ดังนี้

Grid parameter:

- Number grid points in xyz = 120 x 70 x 70
- xyz-coordinates = -2.381, 1.819, -6.527
- Spacing (Å) = 0.5 Å

Docking parameter:

- Number GA run = 100
- Number of individuals in population = 150
- Maximun number of energy evaluations = 2.5, 5, 10, 15, 20 M

ผลจากการทำ validation ของ Autodock parameter โดยใช้ curcumin เป็นตัวแทนพบว่า ลักษณะการจับ จำนวน และค่า binding energy ของ curcumin ไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละพลังงานที่ใช้ แต่ที่พลังงาน 5 M cluster ที่ 1 มีความแตกต่างของค่าพลังงานโดดเด่นกว่า cluster ที่ 2 ชัดเจน ดังแสดงในตารางที่ 5 ดังนั้น parameter ที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ

Macromolecule PDB code: 1Z0Q (residue 1-40)

Ligand (สารทดสอบ): k1-k38

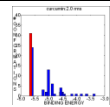
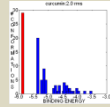
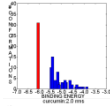
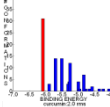
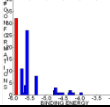
Grid parameter:

- Number grid points in xyz = 120 x 70 x 70
- xyz-coordinates = -2.381, 1.819, -6.527
- Spacing (Å) = 0.5 Å

Docking parameter:

- Number GA run = 100
- Number of individuals in population = 150
- Maximun number of energy evaluations = 5 M

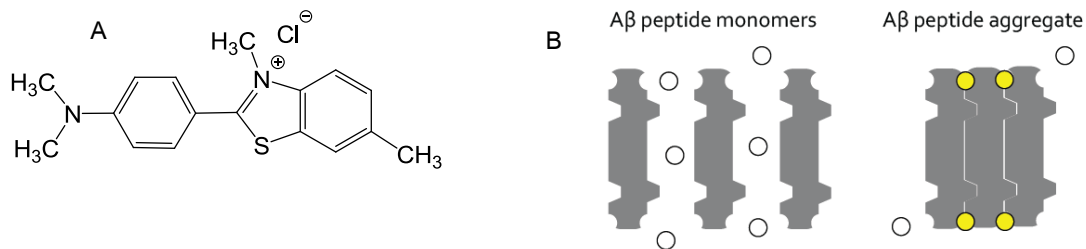
ตารางที่ 5 แสดงค่า maximum number (M) ที่ใช้ในการทำ molecular docking

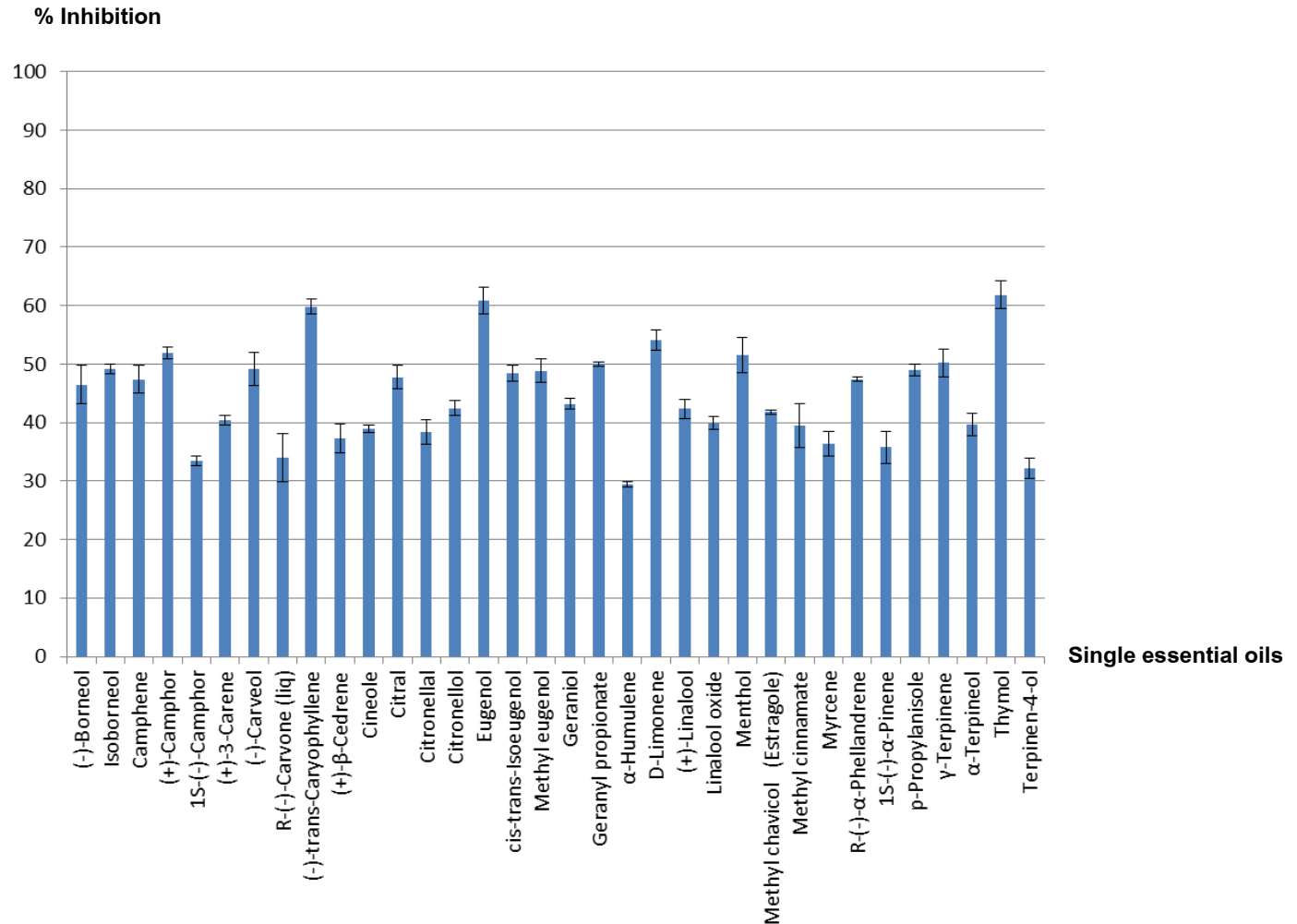
energy (M)	cluster	%	binding energy	# H-bond	amino acid	
2.5	1	31	-5.66	3	Glu11, His14, Lys16	
5	1	29	-5.87	3	Glu11, His14, Lys16	
10	1	31	-6.05	3	Glu11, His14, Lys16	
15	1	31	-6.09	3	Glu11, His14, Lys16	
20	1	32	-5.9	2	Glu11, Lys16	

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

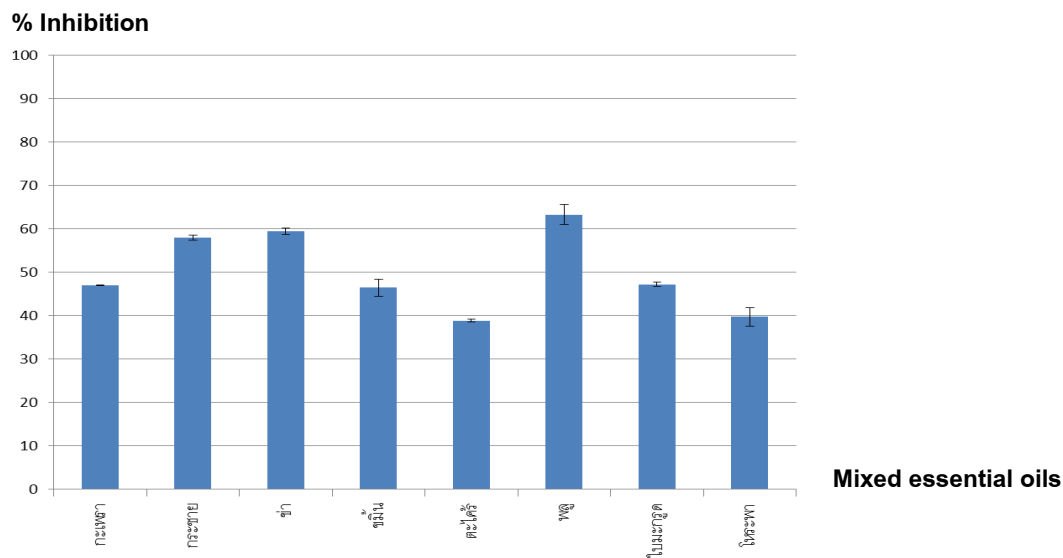
4.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ด้วยวิธี thioflavin T assay

จากที่ได้กล่าวในหัวข้อหลักการและเหตุผลของวิธี thioflavin T assay การเกิดการเรืองแสง fluorescence เกิดเมื่อโมเลกุลของ thioflavin T จับกับโปรตีน A β ที่เกิดการเกาะกลุ่มกันเรียบร้อยแล้ว โปรตีนสายเดี่ยวจะไม่จับโมเลกุลของ thioflavin T รูปที่ 1 แสดงกลไกการเรืองแสง fluorescence ของ thioflavin T

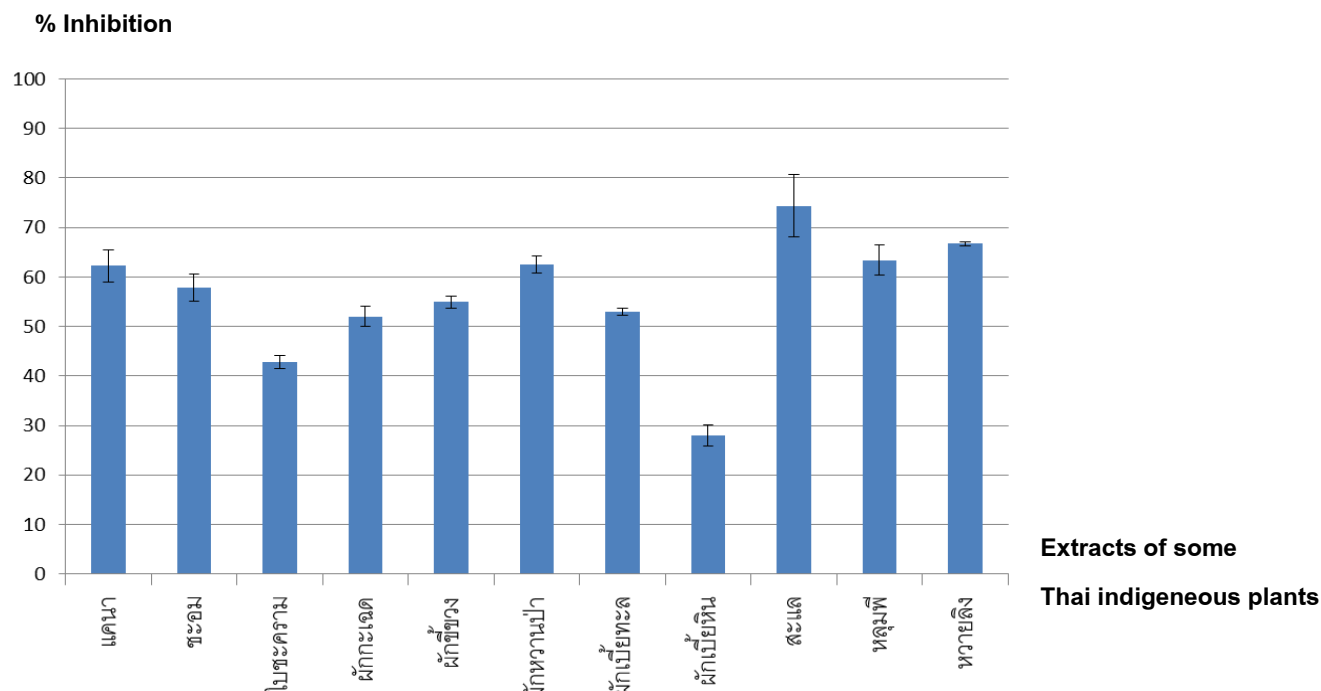




รูปที่ 2 ค่าการยับยั้งการเกิดการเกาะกลุ่มของ Aβ ของสารทดสอบน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว จำนวนทั้งหมด 34 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 μM (mean±SD, n = 3) ค่าการยับยั้งของ curcumin = 93.22% ± 2.64



รูปที่ 3 ค่าการยับยั้งการเกิดการเกาะกลุ่มของ Aβ ของสารทดสอบน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม จำนวนทั้งหมด 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 μg/mL (mean±SD, n = 3) ค่าการยับยั้งของ curcumin = 90.42% ± 3.39



รูปที่ 4 ค่าการยับยั้งการเกิดการเกาะกลุ่มของ A β ของสารทดสอบที่เป็นสารสกัดของพืชพื้นบ้าน จำนวนทั้งหมด 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ (mean $\pm$ SD, n = 3) ค่าการยับยั้งของ curcumin = 91.55% $\pm$ 4.18

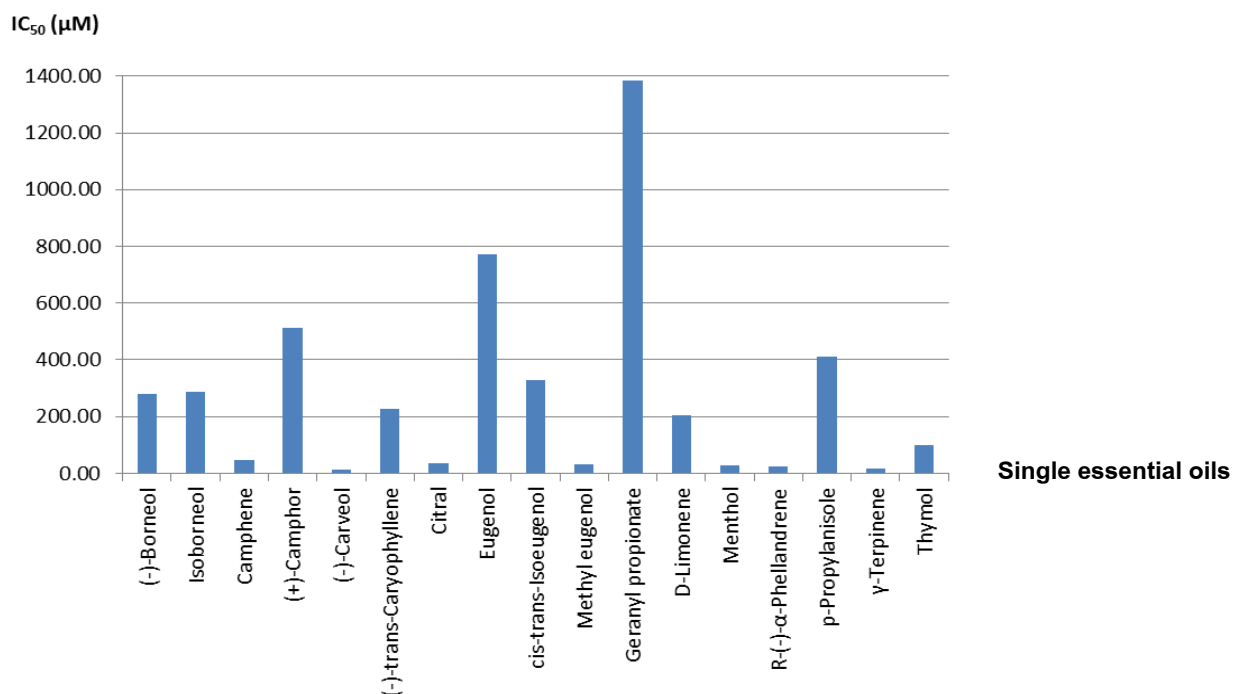
จากการทดลอง สารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ได้มากกว่า 45% ได้ถูกเลือกเพื่อนำมาหาค่า IC₅₀ ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 32 ชนิด แบ่งเป็น สารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว จำนวน 17 ชนิด ได้แก่ (-)-borneol, isoborneol, camphene, (+)-camphor, (-)-carveol, (-)-trans-caryophyllene, citral, eugenol, cis-trans-isoeugenol, methyl eugenol, geranyl propionate, D-limonene, menthol, R(-)- α -phellandrene, p-propylanisole, γ -terpinene, thymol สารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบผสม จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ กระเพรา, กระชาย, ข่า, ขมิ้น, พลู, ใบมะกรูด และสารทดสอบที่เป็นสารสกัดจากพืชพื้นบ้าน จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ แคนา, ชะอม, ผักกะเจด, ผักชีขวง, ผักหวานป่า, ผักเบี๋ยทะเล, สะแล, หลุมพี, หวายลิง

ตารางที่ 6 แสดงค่า IC₅₀ ของสารทดสอบทั้ง 32 ชนิด รูปที่ 5 และ 6 แสดงค่าการยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ของสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว และสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบผสมและสารสกัดพืชพื้นบ้าน ตามลำดับ

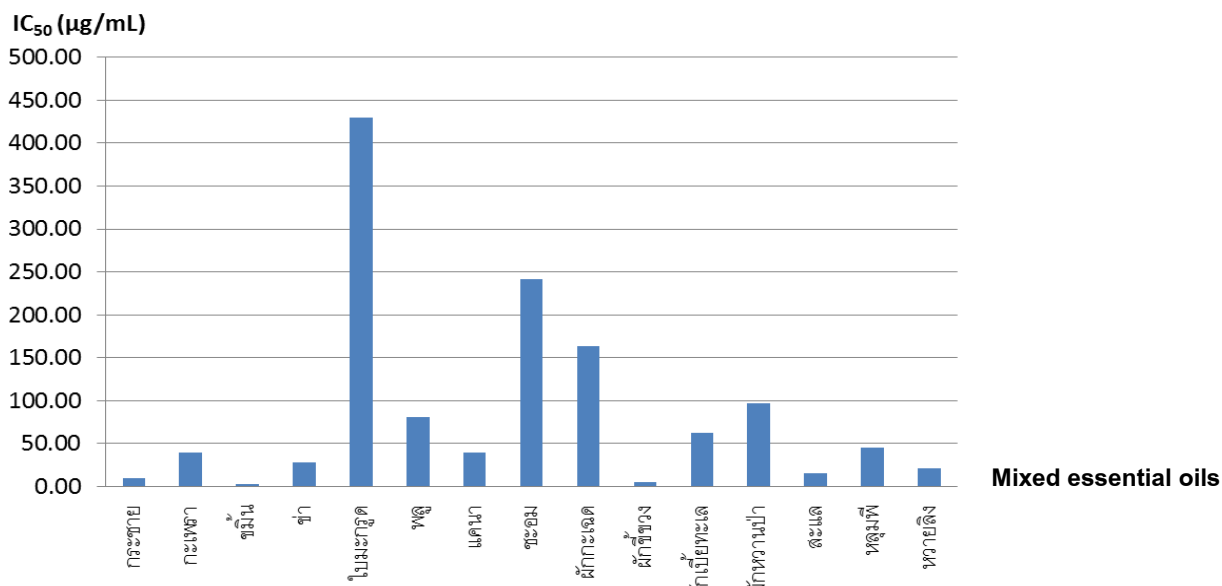
ตารางที่ 6 แสดงค่า IC_{50} การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ของสารทดสอบ จำนวน 32 ชนิด

สารทดสอบ	IC_{50} (μ M)	สารทดสอบ	IC_{50} (μ g/ml)
(-)-borneol	279	กระเพรา	39
isoborneol	286	กระชาย	10
camphene	47	ข่า	28
(+)-camphor	513	ขมิ้น	3
(-)-carveol	12	พลู	80
(-)-trans-caryophyllene	228	ใบมะกรูด	429
citral	35	แคนนา	40
eugenol	770	ชะอม	242
cis-trans-isoeugenol	329	ผักกะเจต	163
methyl eugenol	33	ผักชีฝรั่ง	5
geranyl propionate	1386	ผักหวานป่า	63
D-limonene	203	ผักเบี้ยทะเล	97
menthol	27	สะแล	15
R-(-)- α -phellandrene	24	หลุมพี	45
p-propylanisole	413	หว่ายลิง	21
γ -terpinene	17	Curcumin*	0.77
thymol	100		

*Positive control



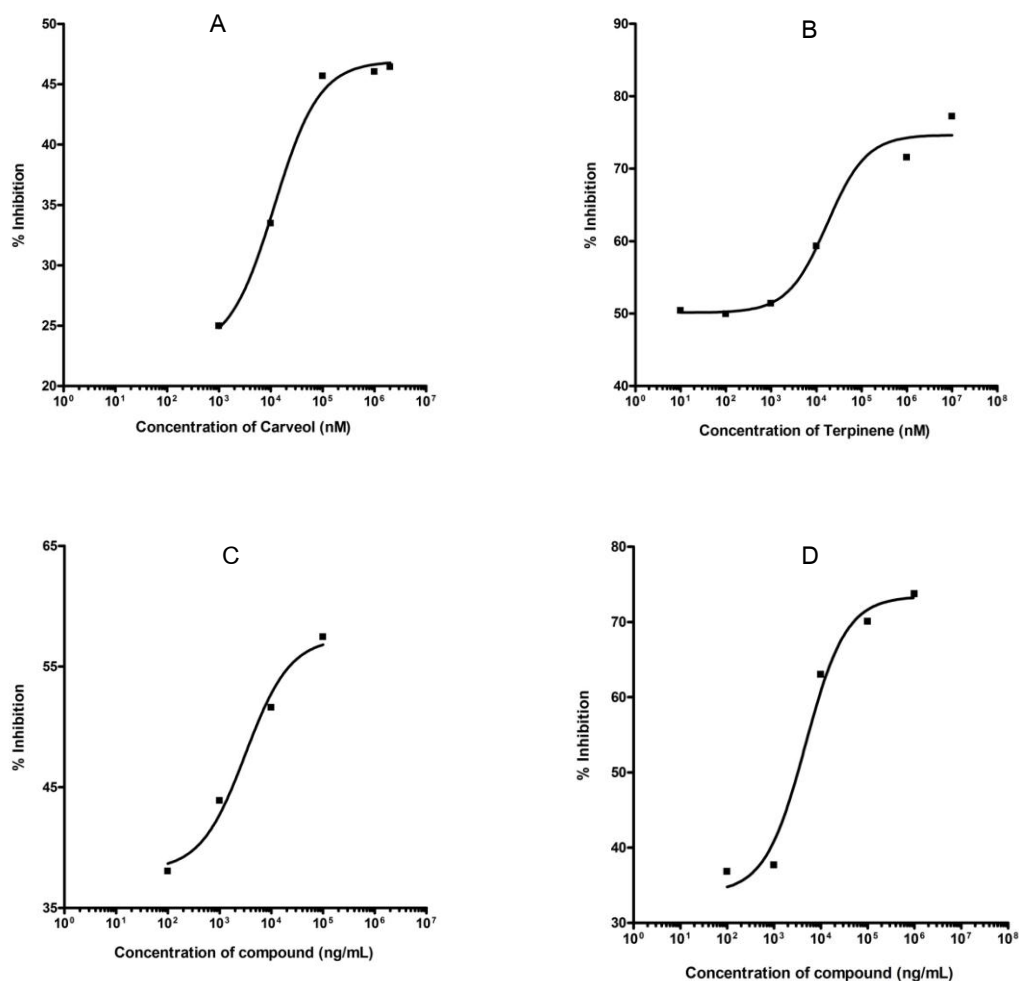
รูปที่ 5 ค่า IC₅₀ ของการยับยั้งการเกิดการเกาะกลุ่มของ Aβ ของสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว จำนวนทั้งหมด 17 ชนิด



รูปที่ 6 ค่า IC₅₀ ของการยับยั้งการเกิดการเกาะกลุ่มของ Aβ ของสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบผสมและสารสกัดพืชพื้นบ้าน จำนวนทั้งหมด 15 ชนิด

จากผลการทดลองสำหรับสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวพบว่า (-)-carveol เป็นสารที่มีค่า IC₅₀ น้อยที่สุดคือเท่ากับ 12 μM สารทดสอบในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยแบบผสมที่มีค่า IC₅₀ ต่ำที่สุดคือ น้ำมันจากขมิ้น มีค่า

เท่ากับ 3 μM สำหรับสารทดสอบในกลุ่มสารสกัดพืชพื้นบ้านที่มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดคือ ผักชีขวง มีค่าเท่ากับ 5 μM กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ $\text{A}\beta$ และความเข้มข้น ของสารทดสอบ บางตัวที่มีฤทธิ์ดี แสดงในรูปที่ 7

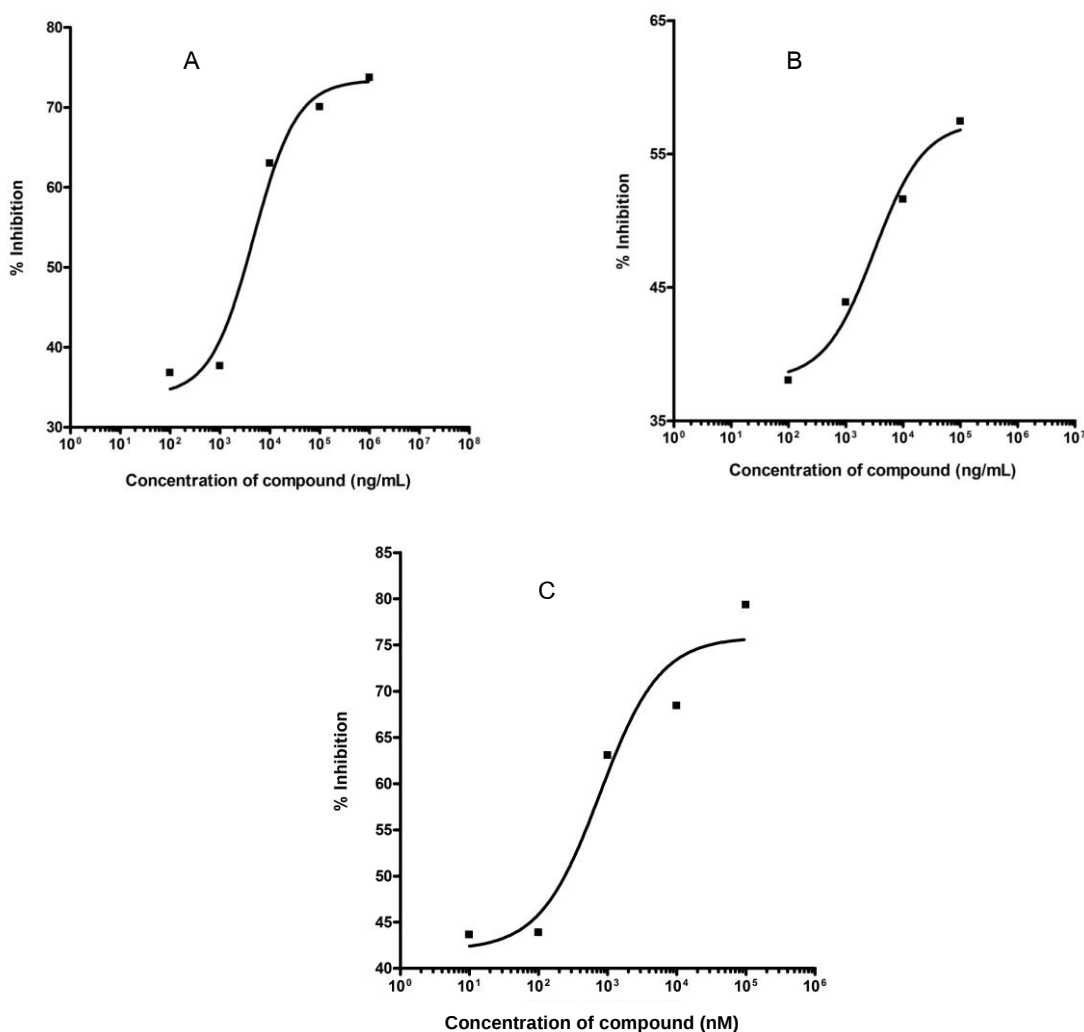


รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ $\text{A}\beta$ และความเข้มข้น ของสารทดสอบ A = (-)-carveol B = γ -terpinene C = ลิโมน D = ผักชีขวง

เมื่อพิจารณาจากสูตรโครงสร้างของสารทดสอบในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวพบว่า สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ $\text{A}\beta$ ได้ดี จะเป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็น unsaturated monocyclic molecule เช่น γ -terpinene หรือ R(-)- α -phellandrene ที่มีโครงสร้างเป็น unsaturated monocyclic alcohol เช่น (-)-carveol หรือ saturated monocyclic alcohol เช่น menthol เป็นต้น สารที่มีลักษณะเป็น monocyclic alkene แต่มีฤทธิ์น้อยคือ limonene สารทดสอบที่มีวงเบนซินเป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ต่ำ เช่น menthol *p*-propylanisole หรือ eugenol ยกเว้น methyl eugenol สารทดสอบที่มีลักษณะเป็น unsaturated alicyclic เช่น citral จะมีฤทธิ์ดีในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของ $\text{A}\beta$ นอกนั้นมีฤทธิ์ต่ำ รวมทั้งสารที่มีความซับซ้อนของโครงสร้าง เช่นกลุ่ม saturated และ unsaturated bicyclic molecule

สำหรับสารทดสอบในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยแบบผสมที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ ขมิ้น มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3 $\mu\text{g/ml}$ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะน้ำมันชนิดนี้มีส่วนประกอบของ curcuminoid ซึ่งประกอบด้วย curcumin demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin โดยเฉพาะ curcumin ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ $A\beta$ ได้ดีมาก ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้ curcumin เป็น positive control สำหรับสารทดสอบที่เป็นสารสกัดจากผักพื้นบ้านพบว่า ผักชีขวงให้ค่าการยับยั้งการเกาะกลุ่มของ $A\beta$ ได้ดีที่สุดคือมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5 $\mu\text{g/ml}$ เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลของสารสำคัญที่เป็นส่วนประกอบหลักในผักชีขวง จึงยังไม่สามารถอธิบายเหตุผลที่ทำให้สารสกัดชนิดนี้มีฤทธิ์ดีที่สุดได้

รูปที่ 8 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ $A\beta$ และความเข้มข้น ของขมิ้น ผักชีขวง และ curcumin ตามลำดับ



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ $A\beta$ และความเข้มข้น ของสารทดสอบ A = ขมิ้น B = ผักชีขวง C = curcumin

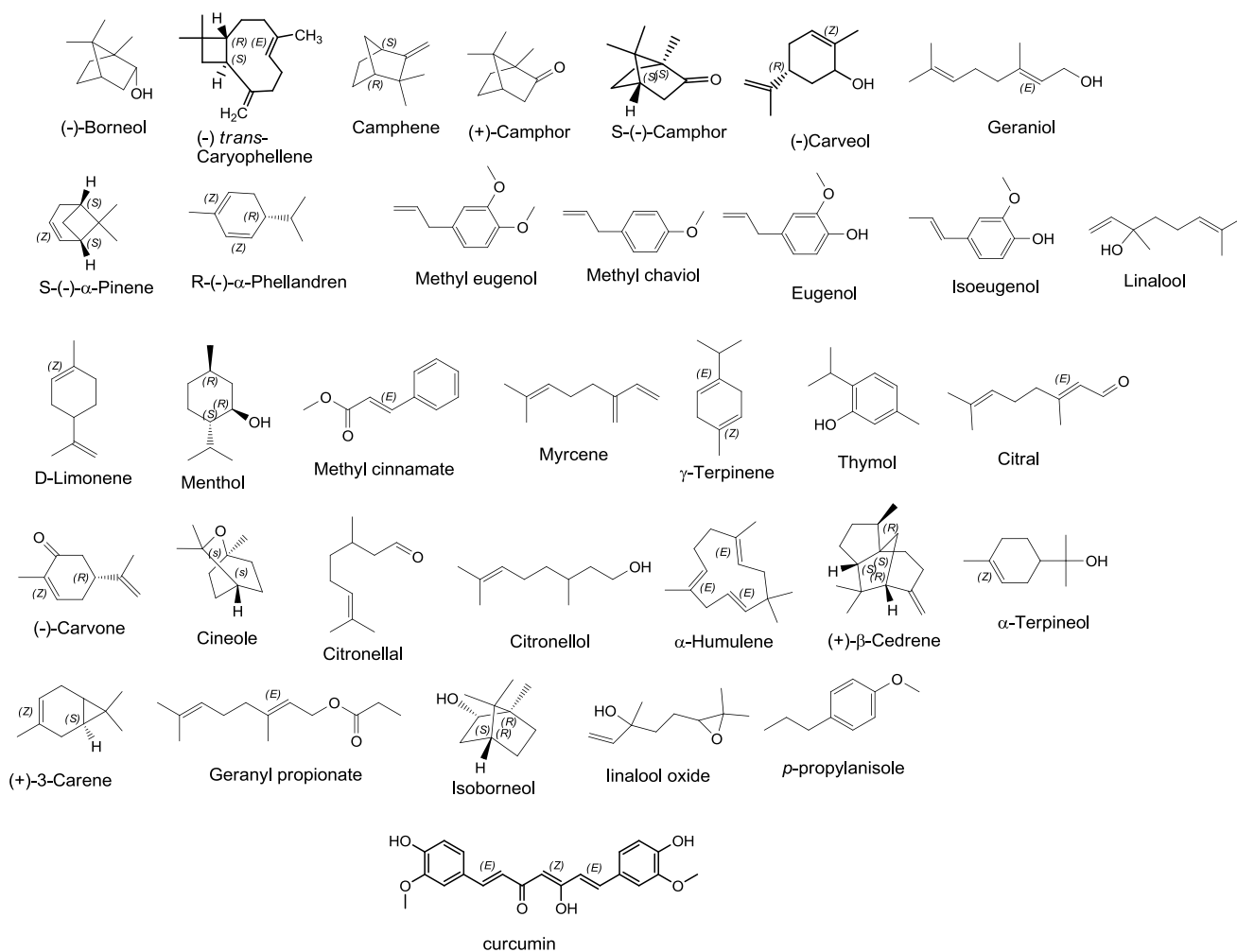
4.2 การศึกษา binding interaction ด้วย molecular docking

เพื่อให้เข้าใจการจับกันระหว่างสารทดสอบและ $A\beta$ peptide ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการยับยั้ง $A\beta$ aggregation ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคทาง molecular docking โดยใช้โปรแกรม Autodock version 4.0 ศึกษาแบบจำลองการเกิด

interaction ระหว่างสารทดสอบที่เป็น oil เดี่ยวๆ และ A β peptide (โมเดลแบบ 3 มิติ) ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 42 ตัว ซึ่ง download ได้จาก Protein data bank (PDB) โมเดลแบบ 3 มิติของ A β peptide ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มี pdb code คือ 1Z0Q ในการศึกษาเริ่มต้นจากการวาดภาพโครงสร้างของสารทดสอบแบบสองมิติ จากนั้นทำให้เป็นสามมิติ และหา conformation ที่มีค่าพลังงานต่ำที่สุด ทั้งหมดนี้จะใช้โปรแกรม Sybyl version 8.1 รูปที่ 9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวและ curcumin

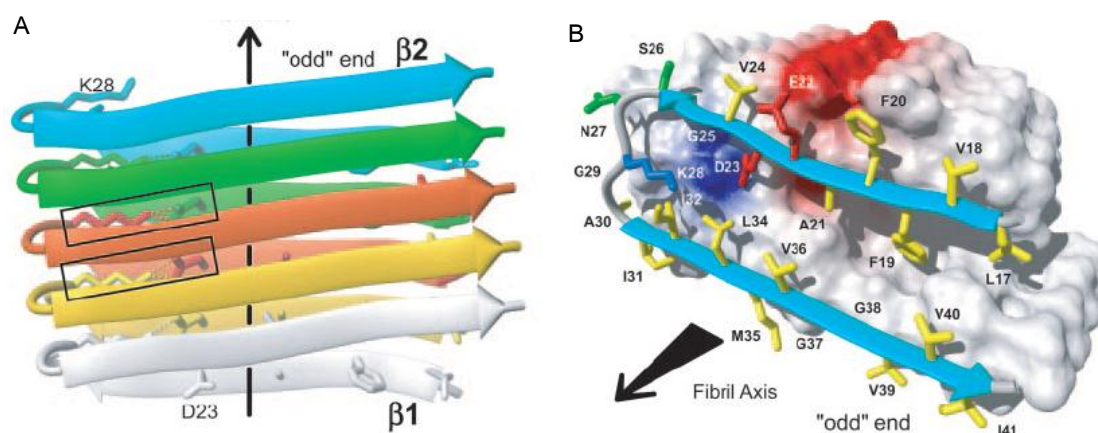
ผลจากการทำ docking พบว่าสารทดสอบทุกตัวมีค่า binding energy ไม่แตกต่างกันมากนัก ค่าที่ได้อยู่ในช่วง -5.13 - -3.15 kcal/mol ทั้งนี้ curcumin ซึ่งทำหน้าที่เป็น positive control มีค่า binding energy ต่ำสุดอยู่ที่ -5.87 kcal/mol ผล docking ของสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวและ curcumin แสดงใน ตารางที่ 1 ภาคผนวก

เนื่องจากสารทดสอบส่วนใหญ่เป็นสารโมเลกุลเล็กและมีหมู่ polar น้อย แรงที่ทำให้เกิด interaction ระหว่างสารและ A β peptide ส่วนใหญ่จึงเป็นชนิด hydrophobic interaction นอกนั้นอาจมี dipole induce dipole, dipole-dipole, และ hydrogen bond interaction ร่วมด้วย



รูปที่ 9 แสดงโครงสร้างแบบสองมิติของสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว และ curcumin

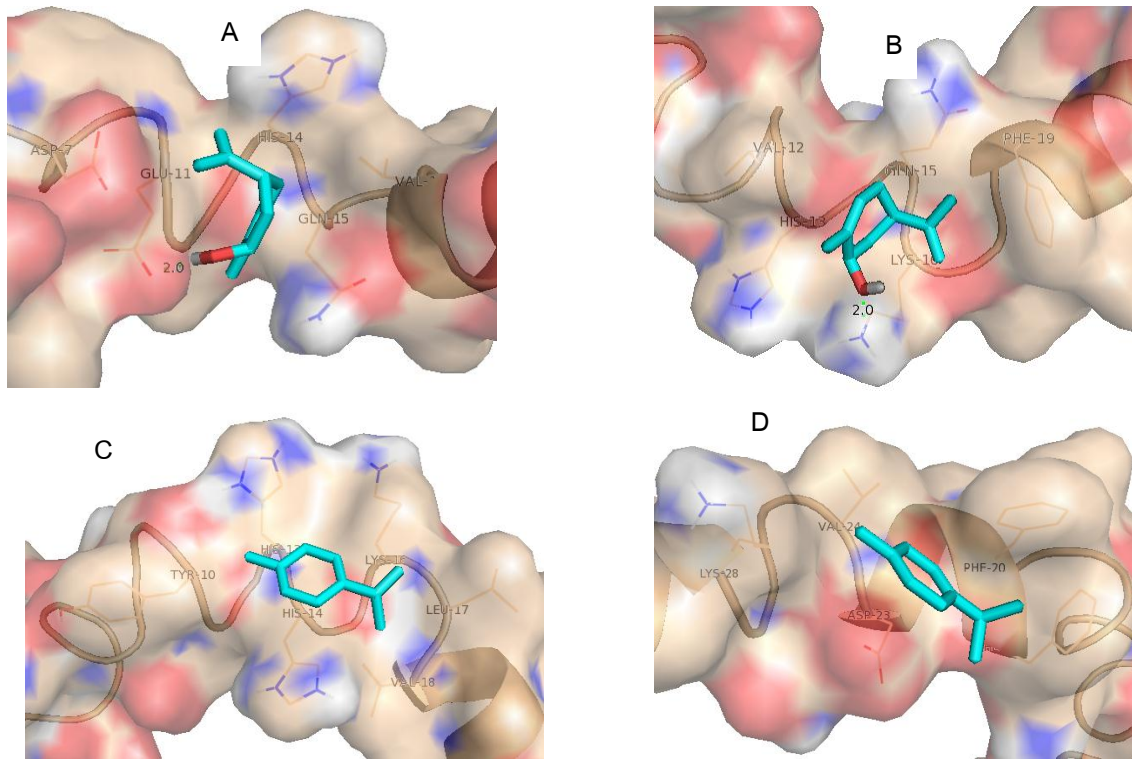
จากรายงานพบว่าการเกิดการเกาะกลุ่มของ A β มีลักษณะเป็น β sheet ซึ่งเกิดได้ทั้ง 2 แบบคือ parallel และ anti-parallel โดยเกิดทั้ง inter- และ intramolecular interactions ตำแหน่งสำคัญบน A β peptide ที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันเองของ A β แบ่งได้เป็น 2 บริเวณ คือบริเวณ hydrophilic region ได้แก่ amino acid sequence Asp23 – Lys28 (D23 – K28) ในช่วงนี้จะเกิด hydrogen bond interaction และ dipole-dipole interaction บริเวณ hydrophobic regions ได้แก่ amino acid sequence Leu17 – Ala21 (L17 – A21) และ Gly29 – Met35 (G29 – M35) (รูปที่ 10) บริเวณเหล่านี้จึงจัดเป็น binding site ที่สำคัญที่ใช้ในการออกแบบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β โดยสารที่สามารถจับกับ A β ที่บริเวณดังกล่าวข้างต้นมีแนวโน้มยับยั้งการเกาะกลุ่ม A β ได้ [21, 26-28]



รูปที่ 10 (A) แสดงภาพ side view การเกิด intermolecular interaction ของ salt bridge (จุดประ) ระหว่าง amino acid residues D23 และ K28 (B) แสดงภาพ top view โดยลูกศรสีฟ้าแสดง β -sheet และรูปคลื่นสีเทาแสดงถึงการเกาะกลุ่มกันเป็น secondary structure โดย amino acid side chains การเกาะกลุ่มแสดงเป็นสีต่างๆกัน คือ hydrophobic, polar, negatively charged และ positively charged แสดงเป็นสี เหลือง, เขียว, แดง และน้ำเงินตามลำดับ

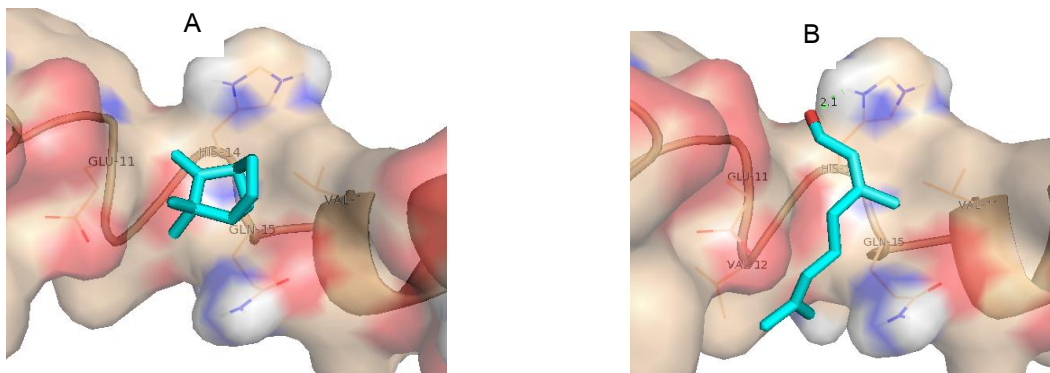
จากที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ของสารทดสอบที่เป็น oil เดี่ยวสามารถแบ่งลักษณะโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีลักษณะเป็น unsaturated และ saturated monocyclic ring ได้แก่ (-)-carveol γ -terpinene limonene หรือ menthol กลุ่มที่มีส่วนประกอบของวงเบนซีน เช่น thymol methyl eugenol หรือ *p*-propylanisole และกลุ่มที่เป็น unsaturated alicyclic ได้แก่ citral เป็นต้น

บริเวณ binding site ของ A β peptide ที่จับกับสารทดสอบส่วนใหญ่อยู่ในช่วง amino acid sequence 10-19 ของ A β peptide ซึ่งเป็นช่วง hydrophobic regions สารที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ (-)-carveol สำหรับ binding interaction เกิดจาก hydrogen bond ระหว่างหมู่ OH ของ (-)-carveol กับ Glu11 (hydrogen bond acceptor) หรือ Lys16 (hydrogen bond donor) นอกจากนี้ยังเกิด dipole induce dipole และ dipole-dipole ระหว่าง -OH ของสารกับ GLU11 หรือ Lys16 อีกด้วย (รูปที่ 11 A และ B) สำหรับ γ -terpinene สามารถจับได้ทั้งบริเวณ hydrophobic และ hydrophilic regions การจับจะใช้แรง hydrophobic รวมทั้ง dipole induce dipole เนื่องจากไม่มีส่วนของอะตอมที่มีขั้วมาเกี่ยวข้อง (รูปที่ 11 C และ D)



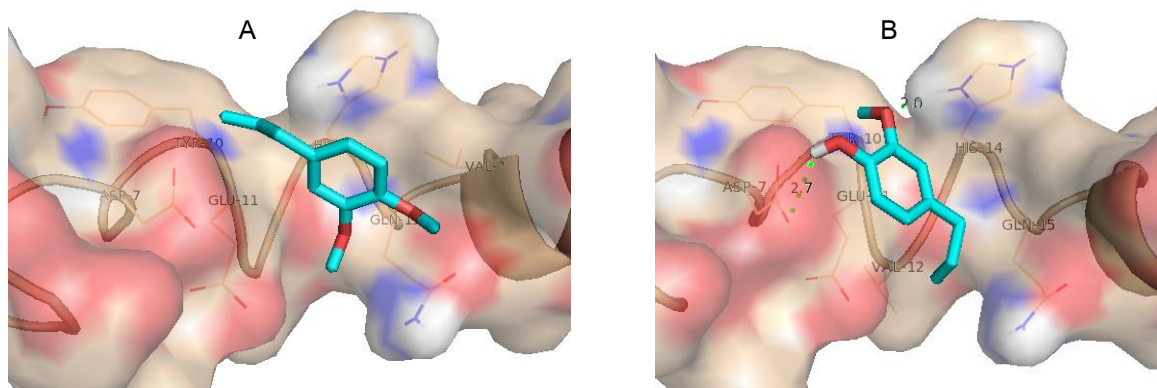
รูปที่ 11 การเกิด binding interaction ระหว่าง $A\beta_{(1-42)}$ กับ A) (-)-carveol แบบที่ 1, B) (-)-carveol แบบที่ 2, C) γ -terpinene ที่บริเวณ hydrophobic region, D) γ -terpinene ที่บริเวณ hydrophilic region

ในกรณีของ camphene จะพบว่าโครงสร้างไม่มีส่วนของ polar group ทำให้ binding interaction ที่เกิดขึ้นเป็น hydrophobic และ dipole induce dipole interaction กับ amino acid ของ Glu11, His14, Gln15, และ Val18 ตามลำดับ (รูปที่ 12A) สำหรับ citral ซึ่งจัดเป็น unsaturated alicyclic compound จับได้ดีที่บริเวณใกล้เคียงกับ curcumin ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีลักษณะเป็นสายยาวที่เหมือนกัน ทั้งนี้จะเกิด H-bond ระหว่าง O ของ $-C=O$ ของ citral กับ His14 นอกนั้นจะเกิด hydrophobic interaction กับ Glu11, Val12, His14, Gln15, และ Val18 ตามลำดับ เกิด dipole induce dipole กับ Glu11 และ Val12 (รูปที่ 12B)



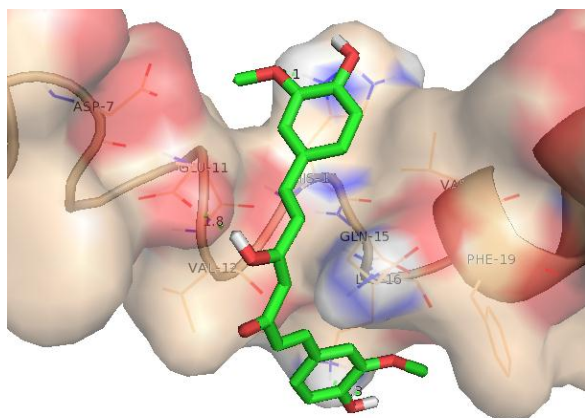
รูปที่ 12 การเกิด binding interaction ระหว่าง $A\beta_{(1-42)}$ กับ A) camphene, B) citral

ในกรณีของ methyl eugenol และ eugenol ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่มที่มีวงเบนซินเป็นส่วนประกอบ การ binding ของ methyl eugenol จะเกิด hydrophobic interaction ระหว่างสารกับ A β peptide ที่ตำแหน่ง Tyr10, Glu11, His14, Gln15, และ Val18 (รูปที่ 13A) ในขณะที่ eugenol ซึ่งมีฤทธิ์น้อยกว่า การจับกับ A β peptide จะแตกต่างกันเล็กน้อย ทั้งนี้เพราะหมู่ OH ของ eugenol จะเกิด hydrogen bond โดยเกิด hydrogen bond donor กับ Asp7 และ hydrogen bond acceptor กับ His14 (รูปที่ 13B) การเกิด hydrophobic interaction จะเกิดกับตำแหน่ง Asp7, Glu11, His14, และ Gln15 ของ A β peptide สำหรับ citral การเกิด hydrogen bond เกิดขึ้นระหว่าง O ของหมู่ C=O ของสารกับ H ของหมู่ NH ใน His14 นอกนั้นจะใช้ hydrophobic และ ion induce dipole interaction



รูปที่ 13 การเกิด binding interaction ระหว่าง A β ₍₁₋₄₂₎ กับ A) methyl eugenol, B) eugenol, C) citral

สำหรับ curcumin ที่ใช้เป็น positive control ในการทำวิจัยชิ้นนี้พบว่าสารตัวนี้สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ได้ 90% ที่ความเข้มข้น 100 μ M และจากการศึกษาแบบจำลองการเกิด binding interaction ระหว่าง curcumin และ A β ₍₁₋₄₂₎ ด้วย molecular docking พบว่าสารตัวนี้ให้ค่า binding energy ต่ำสุดคือ -5.87 kcal/mol และเนื่องจากเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่าสารทดสอบและมีส่วนประกอบของโครงสร้างทางเคมีแบบ aromatic, alicyclic, และหมู่ที่สามารถเกิด hydrogen bond ในลักษณะที่เป็น dimer ทำให้เกิด binding interaction ได้ดีกับ A β บริเวณที่ใช้ในการจับได้แก่ Glu11, His14, Lys16 จะเกิด hydrogen bond กับหมู่ enol, methoxy, และ hydroxyl ตามลำดับส่วนของ Glu11, Val12, His14, Gln15, Lys16, Val18, และ Phe19 จะเกิด hydrophobic interaction กับส่วนที่ non-polar ของ curcumin และที่ amino acid Glu11, Val12, Gln15, His14, และ Lys16 ยังสามารถเกิด dipole induce dipole และ dipole-dipole interaction รวมด้วย รูปที่ 14 แสดงการเกิด binding interaction ของ curcumin บน A β ₍₁₋₄₂₎



รูปที่ 14 การเกิด binding interaction ระหว่าง A β ₍₁₋₄₂₎ กับ curcumin

5. สรุปผลการทดลอง

จากการทำวิจัย สามารถทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ของสารทดสอบจำนวน 53 ชนิด แบ่งเป็น น้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว จำนวน 34 ชนิด น้ำมันหอมระเหยแบบผสม จำนวน 8 ชนิด และสารสกัดพืชพื้นบ้าน จำนวน 11 ชนิด จากการทดสอบพบว่าสารทดสอบในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวที่มีค่า IC₅₀ ไม่เกิน 50 μ M มีทั้งหมด 7 ชนิด คือ (-) carveol (12 μ M), γ -terpinene (17 μ M), R-(-)- α -phellandrene (24 μ M), menthol (27 μ M), methyl eugenol (33 μ M), citral (35 μ M), camphene (47 μ M) สำหรับสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบผสมพบว่า น้ำมันจากขมิ้น มีฤทธิ์ดีที่สุดโดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3 μ g/mL สำหรับสารสกัดจากพืชพื้นบ้านพบว่า ผักชีขวง มีฤทธิ์ดีที่สุดโดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 5 μ g/mL และจากการศึกษาแบบจำลองการจับกันระหว่าง น้ำมันหอมระเหยแบบเดียวกับ A β ₄₂ ด้วยวิธี molecular modeling พบว่า สารส่วนใหญ่จะจับที่ลำดับกรดอะมิโน 10 ถึง 19 ซึ่งเป็นบริเวณ hydrophobic domain ค่าพลังงานที่ได้หลังจากเกิดการจับมีค่าอยู่ในช่วง -3.15 - -5.13 kJ/mol สำหรับ (-) carveol ซึ่งเป็นสารที่มีค่า IC₅₀ ดีที่สุดในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวพบว่า จะจับกับโปรตีน A β ได้ 2 แบบ แบบที่ 1 คือจับกับ Lys16 ด้วยพันธะไฮโดรเจน พันธะ hydrophobic แรง dipole induce dipole และ แรง dipole-dipole จับกับ Gln15 Phe19 ด้วยพันธะ hydrophobic จับกับ Val12 ด้วยแรง dipole induce dipole แบบที่ 2 คือ จับกับ Glu11 ด้วยพันธะไฮโดรเจน พันธะ hydrophobic และ แรง dipole induce dipole นอกนั้นจะจับกับ His14 ด้วยพันธะ hydrophobic และ Gln15 ด้วยพันธะ hydrophobic และ แรง dipole induce dipole

กล่าวโดยสรุป จากงานวิจัยชิ้นนี้พบว่า มีสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยบางตัวทั้งที่เป็นแบบเดี่ยวและแบบผสม สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ได้ เช่นเดียวกับสารสกัดจากพืชพื้นบ้านบางชนิด จึงเป็นแนวโน้มที่ดีที่จะพัฒนาสารเหล่านี้เป็นอาหารเสริมเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาการปกป้อง neuronal cell จากความเป็นพิษที่ถูกกระตุ้นโดย A β รวมทั้งการศึกษาใน *in vivo* เพื่อยืนยันฤทธิ์ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาโมเลกุลของยาตัวใหม่เพื่อใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ได้ต่อไปในอนาคต

6. เอกสารอ้างอิง

1. Katzman R. Epidemiology of Alzheimer's Disease and Dementia: Advances and Challenges. In: Khalid Iqbal, Sisodia SS, Winblad B. ed. *Alzheimer's Disease: Advances in Etiology, Pathogenesis and Therapeutics*: John Wiley & Sons Ltd 2001: 11-21.
2. Onawunmi GO. Effect of dimethylsulfoxide on the antibacterial activity of Lemongrass oil. *Microbe Letter* 1987;36:105-11.
3. Onawunmi GO. *In vitro* studies on the antibacterial activity of phenoxyethanol in combination with Lemongrass oils. *Microbe Letter* 1998;43(1):42-3.
4. Ohno T, Kifa M, Yamaok Y, Imamura S, Yamamoto Y, Mitsufiji S, Kodama T, Kashima K, Iwanishi J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2003;8(3):207-18.
5. Wanissorn B, Jarikasem S, Siriwanthai T, Thubthimthed S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia* 2005;76(2):233-6.
6. Kristinsson KG, Magnúsdóttir AB, Petersen H, *et al.* Effective treatment of experimental acute otitis media by application of volatile fluids into the ear canal. *J Infect Dis* 2005; 191(11), 1876-1880.
7. Viyoch J, Pisutthan N, Faikreua A, *et al.* Evaluation of *in vitro* antimicrobial activity of Thai basil oils and their micro-emulsion formulas against *Propionibacterium acnes*. *Int J Cosmetic Sci* 2006; 28(2), 125-33.
8. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 2004; 35(4), 275-80.

9. Chaisawadi S, Keawboonruang S, Chantawong P. Preliminary study on antibacterial activities of some medicinal herbs for Thai food usage. Proceedings of the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand 2007. Nakorn Si Thammarat, Thailand.
10. Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, *et al.* Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Ethnopharmacol* 2007; 111, 197-201.
11. เกศศิณี ตรีภูมิตวาทกร และ จันทร์เพ็ญ สักดิ์สิทธิ์พิทักษ์. สักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทย. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร 2543;30(3):164-76.
12. Magwa ML, Gundidza M, Gweru N and Humphrey G. Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. *Journal of Ethnopharmacology* 2006;103: 85-9.
13. Cuello AC. Overview of the Alzheimer's Disease Pathology and Potential Therapeutic Targets. In: Cuello AC, ed. *Pharmacological Mechanisms in Alzheimer's Therapeutics*: Springer Science and Business Media, LLC 2007: 1-27.
14. Froelich-Fabre S, Bhat RV. Mechanisms of tauopathies. *Drug Discov Today Dis Mech* 2004;1(4):391.
15. Johnson CN, Roland A, Upton N. New symptomatic strategies in Alzheimer's disease. *Drug Discov Today Ther Strateg* 2004; 1(1): 13.
16. Sascha Weggen EC, Leuchtenberger S, Eriksen J. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) and Derived A β 42-Lowering Molecules for Treatment and Prevention of Alzheimer's Disease (AD). In: Cuello AC, ed. *Pharmacological Mechanisms in Alzheimer's Therapeutics*: Springer Science and Business Media, LLC 2007: 167-193.
17. Vina J, Lloret A, Orti R, Alonso D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2004; 25(1-2): 117.
18. Vardy ERLC and Hooper NM. Secretases as Pharmacological Targets in Alzheimer's Disease. In: Cuello AC, ed. *Pharmacological Mechanisms in Alzheimer's Therapeutics*: Springer Science and Business Media, LLC 2007: 113-124.
19. Yankner W. Presenilins and Notch Signaling Pathway. In: Khalid Iqbal, Sisodia SS, Winblad B. ed. *Alzheimer's Disease: Advances in Etiology, Pathogenesis and Therapeutics*: John Wiley & Sons Ltd 2001:531-539.
20. Czirr E, Weggen S. Gamma-secretase modulation with Abeta42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and derived compounds. *Neuro-degenerative Dis* 2006; 3(4-5): 298-304.
21. Sato T, Kienlen-Campard P, Ahmed M, Liu W, Li H, Elliott JI, *et al.* Inhibitors of amyloid toxicity based on beta-sheet packing of Abeta40 and Abeta42. *Biochemistry*. 2006; 45(17): 5503-5516.
22. Santa-Maria I, Hernández F, Del Rio J, Moreno FJ, and Avila J. Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau. *Molecular Neurodegeneration* 2007; 2:17.
23. Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, *et al.* Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology* 2005; 151: 229–238.
24. Bourhim M, Kruzel M, Srikrishnan T, Nicotera T. Linear quantitation of A β aggregation using Thioflavin T: Reduction in fibril formation by colostrinin. *J Neurosci Meth* 2007; 160: 264-268.
25. Reinke AA and Gestwicki JE. Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: influence of linker length and flexibility. *Chem Biol Drug Des* 2007; 70: 206-215.
26. Lührs T, Ritter C, Adrian M, Riek-Loher D, Bohrmann B, Döbeli H, Schubert D, Riek R. 3D structure of Alzheimer's amyloid-[beta] (1-42) fibrils. *P Natl Acad Sci USA* 2005; 102(48): 17342-17347.
27. Sciarretta KL, Gordon DJ, Petkova AT, Tycko R, Meredith SC. A[beta]40-Lactam(D23/K28) Models a Conformation Highly Favorable for Nucleation of Amyloid. *Biochemistry* 2005; 44(16): 6003-6014.
28. Petkova AT, Buntkowsky G, Dyda F, Leapman RD, Yau WM, Tycko R. Solid State NMR Reveals a pH-dependent Antiparallel [beta]-Sheet Registry in Fibrils Formed by a [beta]-Amyloid Peptide. *J Mol Biol* 2004, 335, (1), 247-260.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 แสดงผล docking ของสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว และ curcumin

Chemical	cluster	%	binding energy	# H-bond	H-bond	hydrophobic	dipole induce dipole	dipole-dipole
(-)-Borneol	1	49	-4.05	1	GLU11 (O)	GLU11, HIS14, GLN15	-	GLU11
(-)-trans-Caryophyllene	1	68	-4.77	-	-	VAL18	GLU11, HIS14, GLN15	-
Camphene	1	90	-3.89	-	-	GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11, GLN15	-
(+)-Camphor	1	100	-4.07	1	LYS16 (H)	GLN15, LYS16	VAL12, GLN15, LYS16	LYS16
S-(-)-camphor	1	99	-4.07	1	LYS16 (H)	GLN15, LYS16	VAL12, GLN15, LYS16	LYS16
(-)-Carveol	1	42	-3.74	1	GLU11 (O)	GLU11, HIS14, GLN15	GLU11, GLN15	-
	3	42	-3.53	1	LYS16 (H)	GLN15, LYS16, PHE19	VAL12, LYS16	LYS16
Geraniol	2	23	-3.63	1	GLU11 (O)	TYR10, GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	ASP7, HIS14	GLU11, GLN15
S-(-)- α -pinene	1	95	-4.13	-	-	GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11, HIS14, GLN15	-
R-(-)- α -phellandren	1	90	-3.83	-	-	VAL18, GLU22	-	-
Methyl eugenol	1	43	-3.84	1	-	TYR10, GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11	-
Methyl chavicol	1	56	-3.46	1	HIS14 (H)	GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11, GLN15	HIS14
Eugenol	1	52	-4.15	2	ASP7 (O), HIS14 (H)	ASP7, GLU11, HIS14, GLN15	GLU11, GLN15	-
	1	8	-3.95	2	ASP7 (O), HIS14 (H)	ASP7, TYR10, GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	ASP7, GLN15	HIS14

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Chemical	cluster	%	binding energy	# H-bond	H-bond	hydrophobic	dipole induce dipole	dipole-dipole
Isoeugenol	2	24	-3.81	1	GLN15 (O)	GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11, HIS14	-
	7	33	-3.66	1	-	GLU11, VAL12, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11	HIS14
	1	14	-3.73	2	GLU11 (O), GLN15 (H)	ASP7, TYR10, GLU11, HIS14, GLN15	ASP7, HIS14	GLN15
Linalool	2	23	-3.59	3	HIS14 (O), LEU17 (H), VAL18 (H)	HIS13, HIS14, LYS16, LEU17, VAL18	-	HIS14, LEU17, VAL18
	3	38	-3.54	1	ASP7 (O)	TYR10, GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11	-
D-Limonene	1	51	-3.81	-	-	HIS13, HIS14, LYS16	HIS14	-
	2	37	-3.74	-	-	GLU11, VAL12, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11, HIS14	-
Menthol	1	55	-3.96	1	VAL12 (O)	VAL12, GLN15, LYS16, PHE19	LYS16	-
Methyl cinnamate	1	68	-4.05	2	HIS14 (H)	TYR10, GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11	ASP7, HIS14
Myrcene	1	83	-3.54	-	-	TYR10, GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	ASP7, GLU11, HIS14	-
γ-Terpinene	1	22	-3.42	-	-	PHE19, PHE20, ASP23, VAL24, LYS28	PHE19, PHE20	-
	2	45	-3.41	-	-	HIS13, HIS14, LYS16, LEU17	HIS14	-
Thymol	1	53	-3.84	1	VAL12 (O)	VAL12, GLN15, LYS16, PHE19	LYS16	-
Citral	2	49	-3.70	1	HIS14 (H)	GLU11, VAL12, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11, VAL12	-
(-)-Carvone	1	45	-4.27	1	HIS14 (H)	HIS14, LEU17, VAL18, ALA21	HIS14, VAL18	HIS14
Cineole	1	48	-3.80	-	-	GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11	GLN15
Citronellal	2	43	-3.45	1	HIS14 (H)	GLU11, VAL12, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11	HIS14

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Chemical	cluster	%	binding energy	# H-bond	H-bond	hydrophobic	dipole induce dipole	dipole-dipole
Citronellol	1	14	-3.38	1	ASP7 (O)	ASP7, TYR10, GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11, HIS14	-
	4	15	-3.21	1	GLU11(O)	TYR10, GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11, HIS14	-
	6	15	-3.15	1	GLN15 (O)	TYR10, GLU11, HIS14, GLN15	ASP7, GLU11, HIS14	-
α -humulene	2	60	-4.65	-	-	GLN15, LYS16, PHE19	VAL12, LYS16	-
(+)- β -cedrene	1	92	-5.13	-	-	GLN15, LYS16, PHE19	VAL12, LYS16	-
α -terpineol	1	37	-4.09	3	HIS14 (O), LEU17 (H), VAL18 (H)	HIS14, LYS16, LEU17, VAL18, ALA21	HIS14	-
	2	36	-3.60	1	GLU11(O)	GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	GLU11, GLN15	-
(+)-3-carene	1	62	-3.89	-	-	HIS14, LYS16, LEU17, VAL18, ALA21	VAL18	-
geranyl propionate	1	33	-4.50	1	HIS14 (H)	TYR10, GLU11, VAL12, HIS14, GLN15	ASP7, GLU11, GLN15	-
Isoborneol	3	55	-3.77	1	LYS16 (H)	GLN15, LYS16, PHE19	GLN15, LYS16	LYS16
	1	40	-4.07	1	GLU11(O)	GLU11, HIS14, GLN15	GLU11	
linalool oxide	1	36	-4.00	3	GLU11 (O), HIS14 (H), GLN15 (H)	TYR10, GLU11, HIS14, GLN15, VAL18	ASP7, GLU11, GLN15	HIS14, GLN15
p-propylanisole	1	53	-3.49	1	HIS14 (H)	GLU11, HIS14, GLN15, VAL18, GLU22	GLU11, GLN15	HIS14
Curcumine	1	29	-5.87	3	GLU11 (O), HIS14 (H), LYS16 (H)	GLU11, VAL12, HIS14, GLN15, LYS16, VAL18, PHE19	GLU11, VAL12, GLN15	HIS14, LYS16

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม

น้ำมันหอมระเหย	สารสำคัญ
กะเพรา	caryophyllene (18.72%), eugenol (18.24%), methyleugenol (46.37%), elemene, sabinene, terpinen-4-ol
กระชาย	camphene (8.30%), d-camphor (16.23%), β -ocimene (27.29%), methyl cinnamate (3.83%), geraniol
ข่า	1,8-cineole (18.76%), β -bisabolen (11.34%), α -pinene (4.52%), methyleugenol (1.18%), terpinen-4-ol, α -zingibirene
ขมิ้น	1,8-cineole (3.44%), phellandrene (4.98%), turmerone (36.37%), terpinolene, α -zingiberene
ตะไคร้	E+Z-citral (41.86%), β -myrcene (5.26%), geranyl acetate (2.45%)
พลู	eugenol (28.33%), eugenyl acetate (14.86%), isoeugenol, β -sitosterol, chavicol, cineol
ใบมะกรูด	β -citronellal (77.11%), citronellyl acetate (6.24%), β -citronellol (5.28%), 2,6-dimethyl-5-heptenal (3.10%), linalool (2.75%), sabinene, β -pinene, (-)-caryophyllene oxide, isopulegol, d-nerolidol
โหระพา	estragole (86.89%), 1,8-cineole (4.27%), camphor (0.75%), α -bergamotene

6. ผลการดำเนินงานเปรียบเทียบกับตารางแผนงาน

กิจกรรมต่าง ๆ เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัยแต่ละข้อ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	ช่วง ระยะเวลา ดำเนินการ	จำนวน วันที่ใช้	ผู้รับผิดชอบ	ผลการดำเนินงาน
1. ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ Aβ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยและพืชพื้นเมืองบางชนิดในประเทศไทย	ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกาะกลุ่มของ Aβ ด้วยวิธี thioflavin T assay	1. การคัดเลือกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำมันหอมระเหยและจากพืชพื้นเมืองบางชนิด เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์	1	10 20	กิตติศักดิ์ <u>หน้าที่</u> แนะนำแนวทางในการหาข้อมูลและทำการตัดสินใจเพื่อเลือกพืชที่ต้องการนำมาทดสอบ น.ศ. เอก <u>หน้าที่</u> ทำการหาข้อมูลทั้งหมดตามคำแนะนำ	คัดเลือกสารในกลุ่ม น้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวจำนวน 34 ชนิด และแบบผสมจำนวน 8 ชนิด และเป็นสารสกัดจากพืชพื้นเมืองจำนวน 11 ชนิด รวมทั้งหมดเท่ากับ 53 ชนิด
		2. ทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อหาค่า % inhibition ของสารที่ได้จากข้อ 1	2-7	80 120	กิตติศักดิ์ <u>หน้าที่</u> เตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ผล น.ศ. เอก <u>หน้าที่</u> ทำการทดสอบฤทธิ์	ทราบฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีน Aβ ที่ความเข้มข้น 100 μM สำหรับน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว ที่ความเข้มข้น 100 μg/mL สำหรับน้ำมันหอมระเหยแบบผสม และสารสกัดจากพืชพื้นเมือง (รูปที่ 2, 3 และ 4 หน้า 18 และ 19)
		3. ทดลองหาค่า IC ₅₀ จากสารที่มีค่า % inhibition ที่น่าสนใจ	2-7	60 120	กิตติศักดิ์ <u>หน้าที่</u> เตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ผล น.ศ. เอก <u>หน้าที่</u> ทำการทดสอบฤทธิ์	สารที่มีค่า %inhibition มากกว่า 45% ในข้อ 2 จะนำมาหาค่า IC ₅₀ ได้ผลตามตารางที่ 6 หน้า 20)

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	ช่วง ระยะเวลา ดำเนินการ	จำนวน วันที่ใช้	ผู้รับผิดชอบ	ผลการดำเนินงาน
2. ศึกษาแบบจำลอง การเกิด interaction ระหว่างสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพกับ โปรตีนแอมิโลยด์ เบต้าด้วยวิธี molecular docking	ศึกษาแบบจำลอง การเกิด interaction ระหว่างสารออก ฤทธิ์ทางชีวภาพ กับโปรตีนแอมี ลอยด์เบต้า โดยใช้ โปรแกรม Sybyl และ Autodock 4.0	1. วาดโครงสร้างทาง เคมีของสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพด้วย โปรแกรม Sybyl และ หา conformation ที่มี ค่าพลังงานต่ำสุดของ สารแต่ละตัว	8	10 20	กิตติศักดิ์ <u>หน้าที่</u> วาดโครงสร้าง ทางเคมีของสารออก ฤทธิ์ทางชีวภาพ และ พิจารณาผลการหา conformation ที่มี พลังงานต่ำสุด น.ศ. เอก <u>หน้าที่</u> ทดสอบหา conformation ที่มีค่าพลังงานต่ำสุดของ โครงสร้างที่วาด	สารทดสอบในกลุ่ม volatile oils ที่ เป็น oil เดี่ยว จำนวน 34 ตัวถูก วาดด้วยโปรแกรม Sybyl version 8.1 และทำให้อยู่ในรูปแบบ conformation ที่มีพลังงานต่ำสุด โดยใช้คำสั่ง Gasteiger-Huckel

หมายเหตุ จำนวนวันที่ใช้เป็นการคาดการณ์จำนวนเวลาที่จะต้องดำเนินการจริง โดยเทียบ 1 วันเท่ากับ 8 ชั่วโมง

เดือนที่	กิจกรรม (activities)	ผลงานที่คาดว่าจะได้รับ (outputs)	ผลงานที่ได้จริง
6 เดือนที่ 1	1. การคัดเลือกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีในพืชผักพื้นเมืองของไทยเพื่อมาทดสอบฤทธิ์ 2. ทำการทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี thioflavin T assay	ทราบผลในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของ โปรตีน A β ของสารทางชีวภาพที่ได้จากพืชจำนวน 53 ชนิด ซึ่งจะเป็นข้อมูลใหม่ให้กับพืชนั้นๆต่อไป	ทราบผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของ A β ของสารทดสอบจำนวน 53 ชนิด แบ่งเป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวจำนวน 34 ชนิดและแบบผสมจำนวน 8 ชนิด และสารสกัดพืชพื้นบ้านจำนวน 11 ชนิด
6 เดือนที่ 2	1. ศึกษาแบบจำลองการเกิด interaction ระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับโปรตีนแอมิลอยด์เบต้า โดยใช้โปรแกรม Sybyl และ Autodock 4.0 2. เตรียมบทความวิชาการ	1. ทราบลักษณะการเกิด interaction ระหว่างสารกับโปรตีน A β แบบ 3 มิติ 2. ได้ข้อมูลในระดับโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีในพืชที่ศึกษา 3. ได้ข้อมูลเพื่อยืนยันผลการทดสอบฤทธิ์โดยสารที่มีค่า IC ₅₀ ต่ำๆควรมีค่า binding energy จากการทำ molecular docking ต่ำด้วย 4. การสร้างแบบจำลองนี้สามารถนำไปออกแบบโมเลกุลยาใหม่เพื่อให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของโปรตีน A β ต่อไป โดยใช้โมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นต้นแบบ 5. บทความวิชาการ	ทราบข้อมูลแบบจำลองการเกิด binding interaction ของสารทดสอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว กับ A β ₁₋₄₂ ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมาย สามารถอธิบายลักษณะการจับกันระหว่างโมเลกุลของน้ำมันหอมระเหยแบบเดียวกับโปรตีน A β ได้

7. ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่น ๆต่อ สกว.

-ประชุมกับนักศึกษาและผู้ช่วยวิจัยเพื่อหารือการทำวิจัยไม่ต่ำกว่า 8 ครั้ง

-ตรวจแก้ผลงานวิจัยที่ทำโดยนักศึกษาและผู้ช่วยวิจัยจำนวน 7 ครั้ง

-เนื่องจากในช่วงเดือนที่ 7-9 เครื่อง microplate reader ไม่สามารถใช้งานได้ จำเป็นต้องมีการเปลี่ยน filter เพราะค่า precision ของการวัดไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แต่หลังจากการเปลี่ยน filter ผลการทดลองที่ได้มีค่าไม่เหมือนเดิม เช่น ค่าการทำ screening test ของน้ำมันหอมระเหย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการทดลองใหม่ทั้งหมด

ลงนาม.....

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่.....