

ผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในหนูแรท ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือด

จินติตา จิตติวัฒน์^{1*}

¹ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44150

*ติดต่อผู้พิมพ์: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44150 อีเมล: jinatta@gmail.com

บทคัดย่อ

ผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในหนูแรทที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือด

จินติตา จิตติวัฒน์^{1*}

ว. เกษตรศาสตร์อีสาน 2560; 13(3) : 68-78

รับบทความ : 9 พฤษภาคม 2560

ตอบรับ : 27 กรกฎาคม 2560

โรคหลอดเลือดสมองเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของการเสียชีวิต การป่วย และภาวะทุพพลภาพจากความผิดปกติของระบบประสาท โดยเฉพาะในผู้ป่วยสูงอายุ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีวิธีการป้องกันและรักษาภาวะผิดปกติดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้น การพัฒนาวิธีการใหม่ๆ ที่จะช่วยผู้ป่วยที่ต้องทุกข์ทรมานจากโรคหลอดเลือดสมองจึงเป็นที่ต้องการอย่างเร่งด่วน การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อภาวะสมองขาดเลือดในหนูแรท การศึกษาครั้งนี้ใช้หนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 300-350 กรัม แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม control กลุ่ม MCAO (Middle cerebral artery occlusion) alone กลุ่ม MACO plus sham laser acupuncture และกลุ่ม MCAO plus laser acupuncture โดยสัตว์ทดลองในกลุ่ม control จะได้รับการผ่าตัดหลอดเลือดโดยไม่มีการสอด filament nylon และไม่ได้รับการรักษาใดๆ ในขณะที่กลุ่ม MCAO alone จะได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery ข้างขวาและไม่ได้รับการรักษาใดๆ ส่วนกลุ่ม MACO plus sham laser acupuncture และกลุ่ม MCAO plus laser acupuncture จะได้รับการรักษาด้วยเลเซอร์ที่จุดฝังเข็มหลอกและจุด Baihui (GV 20) วันละครั้ง ครั้งละ 10 นาที เป็นเวลาต่อเนื่อง 14 วัน หลังจากเสร็จสิ้นการทดลองจะทำการวัดระดับ malondialdehyde (MDA) และ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ catalase (CAT) และ superoxide dismutase (SOD) ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ผลการทดลองพบว่าการรักษาด้วยเลเซอร์ที่จุด Baihui สามารถลดระดับของ MDA และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ CAT และ SOD ในบริเวณฮิปโปแคมปัส ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องการการศึกษาวินิจฉัยถึงกลไกการออกฤทธิ์อื่นๆของการรักษาด้วยเลเซอร์ที่จุด Baihui (GV20) ในภาวะสมองขาดเลือดต่อไป

คำสำคัญ: โรคหลอดเลือดสมอง, การฝังเข็มด้วยเลเซอร์, จุด Baihui (GV20), เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

Effect of Laser Acupuncture on the Activity of Antioxidant Enzymes in Focal Cerebral Ischemic Rat

Jinatta Jittiwat^{1*}

¹ Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150

*Corresponding author: Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150 E-mail: jinatta@gmail.com

Abstract

Effect of Laser Acupuncture on the Activity of Antioxidant Enzymes in Focal Cerebral Ischemic Rat

Jinatta Jittiwat^{1*}

IJPS, 2017; 13(3) : 68-78

Received : 9 May 2017

Accepted : 27 July 2017

Stroke has been regarded as a major cause of mortality, morbidity and prolonged neurological disability particularly in elderly. However, the effective protective and therapeutic strategies had not yet available. Therefore, the development of novel strategy for patients who have suffered from a stroke is urgently required. This study aimed to determine the effect of laser acupuncture on cerebral ischemic rat. Male Wistar rats, weighing 300-350 g, were divided into 4 groups such as control, MCAO (Middle cerebral artery occlusion) alone, MCAO plus sham laser acupuncture and MCAO plus laser acupuncture groups. Rats were subjected to control group were given a sham operation and received no treatment, while right middle cerebral artery occlusion (Rt. MCAO) was induced in rats were subjected to MCAO alone group with no treatment was given. Rats were subjected to either sham laser acupuncture or laser acupuncture, which was performed laser acupuncture 10 min once daily at Baihui (GV20) acupoint for 14 consecutive days after Rt. MCAO. The level of malondialdehyde (MDA) and antioxidant enzymes such as catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in hippocampus were determined at the end of the experiment. The results showed that laser acupuncture at GV20 could decrease MDA level and increase the activity of CAT and SOD in hippocampus. However, the other possible underlying mechanisms are still required to explain actual actions of laser acupuncture treatment.

Keywords: stroke, laser acupuncture, Baihui (GV20) point, antioxidant enzymes

บทนำ

โรคหลอดเลือดสมอง (Stroke) จัดเป็นภาวะฉุกเฉินที่สำคัญในปัจจุบัน โดยองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ระบุสถิติการป่วยด้วยโรคหลอดเลือดสมองในปี พ.ศ. 2551 พบว่ามีประชากรป่วยด้วยโรคนี้มากกว่า 15 ล้านคนทั่วโลก และเสียชีวิตจากโรคนี้ปีละเกือบ 6 ล้านราย หรือประมาณ 10 % ของผู้เสียชีวิตทุกสาเหตุ เฉลี่ยตายนาที่ละ 11 ราย (Mathers *et al.*, 2008) และในประเทศไทยพบว่าโรคหลอดเลือดสมองเป็นสาเหตุการป่วยอันดับที่ 3 รองจากโรค

ความดันโลหิตสูง และโรคเบาหวาน และมีประชากรไทยป่วยเป็นโรคนี้กว่า 2.4 แสนราย และเสี่ยงที่จะเป็นกว่า 10 ล้านคน (Bundhamchareon *et al.*, 2002) นอกจากนั้นยังพบอัตราเสี่ยงการเกิดโรคหลอดเลือดสมองสูงถึง 1,880 คน ต่อประชากร 100,000 คน ในกลุ่มประชากรที่มีอายุช่วง 45-80 ปี (Somsak, 2015) และโรคนี้ถ้าเป็นแล้วแม้รอดชีวิตก็มักจะมีคุณภาพการหลงเหลืออยู่ซึ่งนำมาสู่ค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูง จากการรายงานค่ารักษาพยาบาลในปี 2007 ค่ารักษาพยาบาลของผู้ป่วย

โรคนี้เฉลี่ยสูงถึง 162,664.82 บาทต่อคนต่อปี หรือคิดเฉลี่ยค่ารักษาที่ต้องจ่ายในแต่ละสัปดาห์สูงถึงคนละ 3,117.04 บาท (Orathai *et al.*, 2012)

โรคหลอดเลือดสมอง หรือโรคอัมพฤกษ์ หรืออัมพาต มีสาเหตุสำคัญ 2 ประการ คือ 1. หลอดเลือดในสมองตีบ หรืออุดตัน (พบประมาณ 70%) เกิดจากการตีบหรืออุดตันของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ไปเลี้ยงสมองซึ่งอาจมีปัจจัยเสี่ยงมาจากความดันโลหิตสูง เบาหวาน ภาวะไขมันในเลือดสูง หรือการสูบบุหรี่ เป็นต้น 2. เลือดออกในสมอง (พบประมาณ 30%) ภาวะนี้มักจะสัมพันธ์กับโรคความดันโลหิตสูงที่ไม่ได้รับการรักษา สำหรับในประเทศไทย จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุขพบว่า ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดในสมองตีบ หรืออุดตันแบบเฉียบพลัน ได้รับการรักษาได้ทันเวลามีเพียงร้อยละ 1.96 เท่านั้น ทำให้อัตราการเสียชีวิตและพิการสูงมาก ดังนั้นการป้องกันและการรักษาภาวะนี้จึงจัดเป็นเรื่องสำคัญ

สืบเนื่องจากอุบัติการณ์และค่ารักษาพยาบาลที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นรวมถึงข้อจำกัดในการรักษาภาวะของโรคดังกล่าวทำให้มีการพยายามที่จะใช้สารที่มีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์สมอง (Neuroprotective agent) และการแพทย์ทางเลือกต่างๆเข้ามาช่วยเพื่อให้เซลล์ประสาทในบริเวณที่อยู่ริมๆของส่วนที่ขาดเลือดโดยเฉพาะบริเวณที่เรียกว่า penumbra area พ้นคืนสภาพกลับมาทำงาน ดังนั้น สารที่มีฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์สมอง หรือ การแพทย์ทางเลือกที่มีการพัฒนาขึ้นมาใช้ในการรักษาโรคนี้ปัจจุบันส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งไปยังยังกลไกต่างๆที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาของภาวะสมองขาดเลือด เช่น เพิ่มการไหลของเลือดไปเลี้ยงบริเวณดังกล่าว ยับยั้งการทำงานของ excitatory amino acid ผ่าน N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor รวมทั้งยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระ เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant enzymes) เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase; SOD) กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase; GPx) และ คีตาเลส (Catalase; CAT) เป็นต้น (Cherubini *et al.*, 2000; Kirisattayakul *et al.*, 2013)

การฝังเข็มด้วยเลเซอร์เป็นวิธีการใหม่ที่ใช้แสงเลเซอร์พลังงานต่ำๆเข้าไปตรงตำแหน่งของจุดฝังเข็ม (Acupoint) ตามหลักการของแพทย์แผนจีนแทนการใช้เข็ม ข้อดีของการรักษาด้วยการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ คือไม่มีความเจ็บปวด ปลอดภัย ใช้ระยะเวลาในการรักษาน้อย มีรายงานเมื่อเร็วๆนี้ พบว่าการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ช่วยสามารถเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปยังสมอง (Brain circulation) ได้ (Litscher *et al.*, 2010) ช่วยลดภาวะความจำเสื่อม ลดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative

stress) และการตายของเซลล์สมองในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคพาร์กินสัน (Wattanathorn *et al.*, 2014) และสามารถใช้ในการรักษาอาการต่างๆ เช่น อาการปวด ช่วยเพิ่มการไหลเวียนเลือดลดอาการเวียนศีรษะ เป็นต้น

จุด Baihui (Governor vessel 20; GV20) เป็นจุดฝังเข็มที่อยู่สูงที่สุด อยู่ตรงกลางศีรษะ กึ่งกลางระหว่างใบหูทั้งสองข้าง นับจากชายผมด้านหน้าขึ้นไป 5 cun ซึ่ง 1 cun เท่ากับ 1.5 เซนติเมตร หรือความกว้างของหนึ่งข้อนิ้วหัวแม่มือ (Shen *et al.*, 2011) จุด Baihui เป็นจุดรวมของพลังงาน หยาง (Yang meridian) จุดนี้ใช้ในการรักษาอาการปวดศีรษะ วิงเวียน อาการวิตกกังวล (Anxiety) และโรคหลอดเลือดสมอง จากการศึกษาที่ผ่านมาเมื่อกระตุ้นจุด Baihui (GV20) สามารถช่วยลด oxidative stress โดยการเพิ่มของ antioxidant enzymes และลดภาวะความจำเสื่อมในโรคหลอดเลือดสมองได้ (Jittiwat and Wattanathorn, 2012) นอกไปจากนั้นยังมีการศึกษาของ Wang และคณะ ในปี 2014 พบว่าการฝังเข็มที่จุด Baihui (GV20) สามารถลดปริมาตรการตายของสมอง (Infarct volume) (Wang *et al.*, 2014) สามารถลดการบวมของสมอง (Dong *et al.*, 2009) เพิ่มการไหลเวียนของเลือดไปยังสมองโดยผ่านการทำงานของ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Kim *et al.*, 2013) และลดการอักเสบ (Wang *et al.*, 2012) หลังจากหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดสมอง

อย่างไรก็ตามปัจจุบันนักวิจัยพยายามหาวิธีการป้องกันและรักษาที่มีประสิทธิภาพสำหรับผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองที่เป็นสาเหตุที่สำคัญของการตาย การป่วย และภาวะทุพพลภาพจากความผิดปกติของระบบประสาทโดยเฉพาะในผู้ป่วยสูงอายุ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อภาวะสมองขาดเลือดในหนูแรทเพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นการแพทย์ทางเลือกในการรักษาโรคหลอดเลือดสมองต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้หนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar อายุประมาณ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 300-350 กรัม เป็นสัตว์ทดลองเลี้ยงในสภาวะที่มี light / dark cycle คงที่ประมาณ 12: 12 ชั่วโมง ก่อนเริ่มการทดลองพักสัตว์ที่หน่วยสัตว์ทดลองคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นเวลา 7 วัน และการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองในงานวิจัยนี้เป็นไปตามข้อเสนอในการขอรับพิจารณาจริยบรรณการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทาง

วิทยาศาสตร์ ซึ่งโครงการนี้ได้ผ่านการพิจารณาของ คณะกรรมการจริยบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้ สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นแล้ว โดย ยึดหลักเกณฑ์จริยบรรณการใช้สัตว์ สำนักงานคณะกรรมการ วิจัยแห่งชาติ (AEKKU 28/2558)

การแบ่งกลุ่มการทดลอง

หนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar ถูกแบ่งเป็น 4 กลุ่มการ ทดลอง กลุ่มละ 5 ตัว ประกอบด้วย

1. Control group คือกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดหลอดเลือดโดย ไม่มีการสอด filament nylon เข้าไป (Sham operation) และ ไม่ได้รับการรักษาใดๆ

2. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) alone group คือ กลุ่มที่สัตว์ทดลองทุกตัวจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery โดยการผ่าตัดและ ทำการสอด filament nylon ขนาด 4.0 และสอดเข้าไปประมาณ 17 มิลลิเมตร จากหลอดเลือดแดง common carotid ด้านขวา และไม่ได้รับการรักษาใดๆ

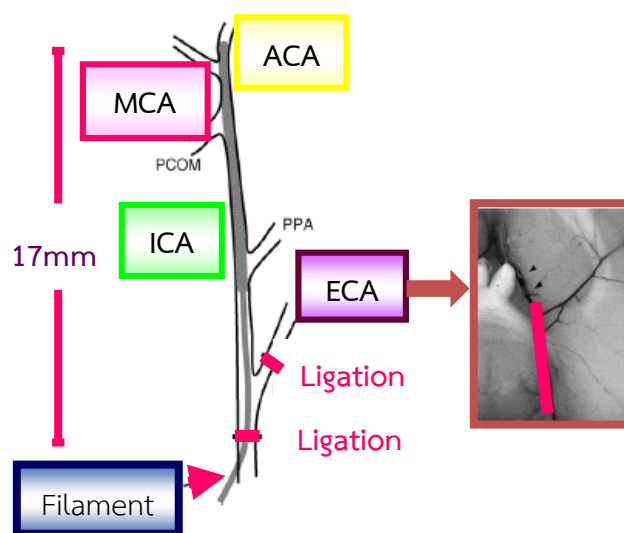
3. Middle cerebral artery occlusion (MCAO)+Sham laser acupuncture group คือ กลุ่มที่สัตว์ทดลองทุกตัวจะถูก เหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery โดยการผ่าตัดและทำการสอด filament nylon ขนาด 4.0 และสอดเข้าไปประมาณ 17 มิลลิเมตร จากหลอดเลือดแดง common carotid ด้านขวา และได้รับการรักษาด้วยเลเซอร์ที่จุด ผังเข็มหลอก ที่ตำแหน่งที่ไม่ใช่ acupoint วันละครั้ง ครั้งละ 10 นาที เป็นเวลาต่อเนื่อง 14 วัน

4. Middle cerebral artery occlusion (MCAO)+Laser acupuncture group คือ กลุ่มที่สัตว์ทดลองทุกตัวจะถูกเหนี่ยวนำ ให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery โดย การผ่าตัดและทำการสอด filament nylon ขนาด 4.0 และสอด เข้าไปประมาณ 17 มิลลิเมตร จากหลอดเลือดแดง common carotid ด้านขวา และได้รับการรักษาด้วยเลเซอร์ที่จุดผังเข็ม acupoint ที่เรียกว่า จุด Baihui (GV20) วันละครั้ง ครั้งละ 10 นาที เป็นเวลาต่อเนื่อง 14 วัน

หลังจากเสร็จสิ้นการทดลองซึ่งเป็นเวลา 14 วัน ทำการ วัดปริมาณการเปลี่ยนแปลงของระดับ malondialdehyde (MDA) และ การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ คีตาเลส (Catalase; CAT) และ ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase; SOD) ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

ขั้นตอนของการเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของ หลอดเลือด middle cerebral artery

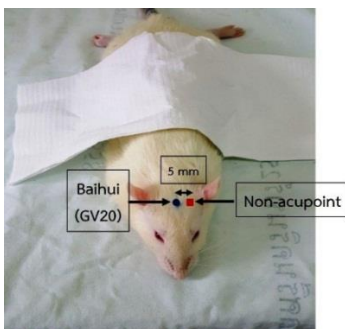
ในขั้นตอนของการเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของ หลอดเลือด middle cerebral artery นั้นหนูทดลองจะถูกวาง ยาหลับด้วย sodium pentobarbital 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก ตัว 1 กิโลกรัม ทางช่องท้อง และ Atropine 5 ไมโครกรัมต่อ น้ำหนักตัว 100 กรัม จะถูกให้ทางช่องท้องเช่นกันเพื่อลดเสมหะ หลังจากนั้นหนูทดลองจะถูกจับให้อยู่นิ่งและยึด ไว้กับโต๊ะ ผ่าตัด right common carotid artery (CCA) bifurcation จะถูก เปิดออก จากนั้น internal carotid artery (ICA) และ external carotid artery (ECA) จะถูกยกออกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอื่นๆที่ อยู่รอบๆและผูก silicone-coated monofilament เบอร์ 4 จะถูก สอดเข้าไปทาง common carotid artery (CCA) หลังจากนั้นก็จะ ผ่านไปตามช่องของ internal carotid artery (ICA) ประมาณ 17 มิลลิเมตร จาก carotid bifurcation หลังจากนั้นก็สอดผ่านไป จนถึง Circle of Willis เพื่อที่จะไปอุดตันเริ่มต้นของ middle cerebral artery ข้างขวา หลังจากการผ่าตัดเสร็จสิ้นจะเย็บปิด แผลที่คอของหนู ทาโพวิโดนไอโอดีนบริเวณแผลผ่าตัด และทำ การดูแลจนกว่าหนูจะฟื้นแล้วนำกลับไปเลี้ยงในกรงต่อ (Bederson *et al.*, 1986)



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงการผ่าตัดเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของ หลอดเลือด middle cerebral artery ข้างขวา โดย ACA คือ anterior cerebral artery, MCA คือ middle cerebral artery, ECA คือ external carotid artery ICA คือ internal carotid artery, CCA คือ common carotid artery

โปรแกรมการรักษาด้วยการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ตามจุดฝังเข็ม

ทำการรักษาโดยวิธีฝังเข็มด้วยเลเซอร์ ที่จุด Baihui (GV20) กำหนดเลเซอร์จากเครื่องเลเซอร์รุ่น Weberneedle® laser โดยใช้ความยาวคลื่น 810 นาโนเมตร แบบเป็นช่วง (Pulse wave) ที่ร้อยละ 50 เส้นผ่านศูนย์กลางของจุดเลเซอร์ 100 ไมโครเมตร สัญญาณเอาต์พุตของเครื่อง 100 มิลลิวัตต์ ซึ่งข้อดีของการใช้เลเซอร์แทนเข็มคือ เป็น non-invasive ไม่มีผลข้างเคียง ไม่มีความเจ็บปวด ปลอดภัย ใช้ระยะเวลาในการรักษาน้อย ซึ่งก่อนทำการรักษา 15 นาที จะดมยาสลบสัตว์ทดลองด้วย sodium pentobarbital 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทางช่องท้อง เพื่อให้ง่ายต่อการรักษา และลดภาวะเครียดกับสัตว์ทดลอง (Yu *et al.*, 2010) จากนั้นปล่อยเลเซอร์ตามจุดฝังเข็มดังกล่าวเป็นเวลา 10 นาทีต่อครั้ง ทำวันละครั้ง เป็นระยะเวลา 14 วัน ซึ่งตามวิธีการนี้ จากการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปยังสมอง (Litscher *et al.*, 2010) และไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อสัตว์ทดลอง



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งจุดฝังเข็ม (Acupoint) ที่เรียกว่า จุด Baihui (GV20) และจุดฝังเข็มหลอก (Non-acupoint) ซึ่งอยู่ห่างจากจุด Baihui (GV20) ออกไปด้านข้าง 5 มิลลิเมตร

การเก็บตัวอย่างหลังสิ้นสุดการทดลอง

หลังจากเสร็จสิ้นการทดลองหนูทดลองจะถูกวางยาสลบด้วย sodium pentobarbital 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทางช่องท้อง ทดสอบความรู้สึกเจ็บปวดของสัตว์ทดลอง (Pain reflex) ให้อยู่ในระดับที่ไม่ตอบสนองต่อความเจ็บปวด (Areflexia) เปิดช่องอกของสัตว์ทดลอง แล้วใช้สารละลาย Normal Saline 0.9% ผสม heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดผ่านไปทาง ascending aorta ฉีดล้างน้ำเลือดออกให้หมด (Perfuse) และเก็บตัวอย่างสมองของ

สัตว์ทดลอง บริเวณฮิปโปแคมปัส ของสมองทั้ง 2 ข้าง เก็บตัวอย่างในตู้แช่ตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์ผลทางชีวโมเลกุลต่อไป

การวิเคราะห์ระดับโปรตีนในตัวอย่าง

ปริมาณโปรตีนตัวอย่างในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส แยกมาบดละเอียดในสารละลายกลีโอฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4 หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยหลักการของ Lowry และคณะ หลักการนี้จะใช้หาโปรตีนในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดโปรตีนมาตรฐานโดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA) ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 2, 4, 6, 8, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นวิธีทำการทดลองในสภาวะเบส โดยคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) จะไปจับกับโปรตีนและเมื่อเติมสารสีเหลืองของ Folin-phenol reagent สารนี้จะไปจับกับสารเชิงซ้อนของโปรตีนกับคอปเปอร์ ซึ่งจะเปลี่ยนสารจากสีเหลืองให้เป็นสีฟ้า นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (Lowry *et al.*, 1951)

การวิเคราะห์การเกิด lipid peroxidation โดยตรวจระดับ MDA

การวิเคราะห์การเกิด lipid peroxidation สามารถวิเคราะห์โดยการวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) โดยนำสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ที่แยกมาบดละเอียดในสารละลายกลีโอฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4 หลังจากนั้นนำมาวัดปริมาณของ MDA ตามวิธีการของ Ohkawa และคณะ หลักการนี้จะใช้หาปริมาณ MDA ในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐาน TMP (1, 1, 3, 3-tetramethoxy propane) ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, และ 10 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร โดยการเติมกรดไทโอบาร์บิทริก (Thiobarbituric acid; TBA) ลงในสารตัวอย่าง ซึ่ง MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทริก ในสภาวะเป็นกรด ได้สารสีชมพู นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (Ohkawa *et al.*, 1979)

การวิเคราะห์ปริมาณแคตาเลส (Catalase; CAT)

นำสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ที่แยกมาบดละเอียดในสารละลายกลีโอฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4 หลังจากนั้นนำมาวัดปริมาณของ CAT ตามวิธีการของ Sohal และ Weindruch หลักการนี้จะใช้หาปริมาณ CAT ในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐาน CAT ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, และ 100 ยูนิตต่อ

มิลลิเมตร โดยเติมสารตัวอย่าง หรือ สารละลายมาตรฐาน ในไมโครเพลท 96 หลุม และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H_2O_2) 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที ใส่ กรดซัลฟูริก 25 ไมโครลิตร ใส่โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (Potassium permanganate; $KMnO_4$) 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (Sohal and Weindruch, 1996)

การวิเคราะห์ปริมาณซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase; SOD)

นำสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ที่แยกมาบดละเอียดในสารละลายกลีเซอรอลฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4 หลังจากนั้นนำมาวัด SOD activity โดยใช้ SOD assay kit (Sigma Aldrich) โดยแซนทีน ออกซิเดส (Xanthine oxidase) และไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Superoxide anion) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่จะทำปฏิกิริยากับ tetrazolium salt ได้เป็น formazan dye ซึ่งมีสีเหลือง ดังนั้น SOD จะเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยานี้โดยเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ แรดิคัล (Superoxide radical) ให้เป็นออกซิเจน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐาน SOD ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ขั้นตอนและวิธีในการวิเคราะห์ข้อมูล

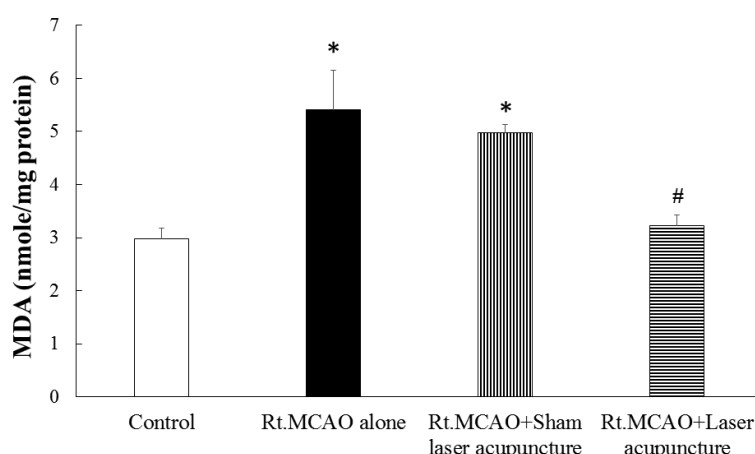
การเปรียบเทียบผลของการรักษาด้วยการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อสมองระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองจะใช้

analysis of variance (ANOVA) และใช้ Fisher's least significant different (LSD) post-hoc test การเปลี่ยนแปลงที่ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติคือตั้งแต่ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

ผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ MDA ในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันหลอดเลือด middle cerebral artery ข้างขวา

ในการทดสอบผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ MDA หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery ข้างขวา โดยการวัดปริมาณ MDA ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส พบว่าหนูที่ได้รับการรักษาด้วยเลเซอร์ที่จุดฝังเข็มหลอก ที่ตำแหน่งที่ไม่ใช่ acupoint (MCAO+Sham laser acupuncture) และหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery ไม่ได้ได้รับการรักษาใดๆ (MCAO alone) มีระดับ MDA มากกว่าหนูในกลุ่มควบคุม (Control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม control) ในขณะที่หนูที่ได้รับการรักษาด้วยการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ที่จุด Baihui (GV 20) (MCAO+Laser acupuncture) สามารถลดระดับของ MDA ได้อย่างมีนัยสำคัญหลังได้รับการรักษาด้วยเลเซอร์ที่จุด Baihui (GV20) เป็นเวลา 14 วันในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส ($p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม MCAO alone) ดังแสดงในรูปที่ 3

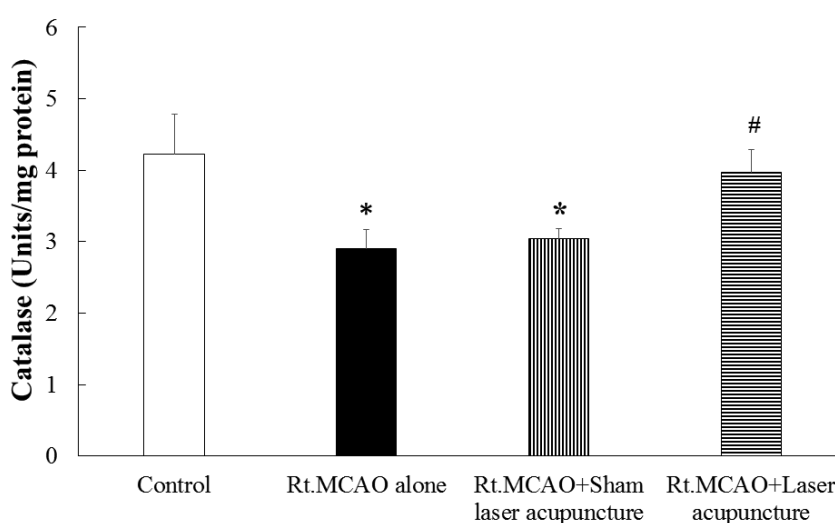


รูปที่ 3 ผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ malondialdehyde (MDA) ในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery ข้างขวา (n=5/กลุ่ม) ค่าที่แสดงเป็น mean±SEM, * $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม control และ # $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม MCAO alone

ผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันหลอดเลือด middle cerebral artery ข้างขวา

จากการศึกษาผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ CAT ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส หลังเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery ด้านขวา พบว่าการทำงานของเอนไซม์ CAT ของหนูที่

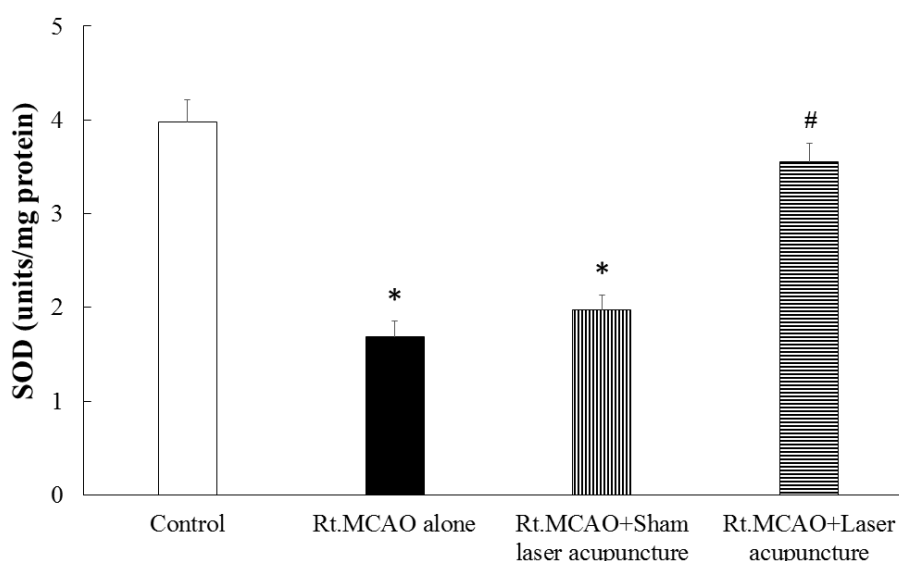
ได้รับการรักษาด้วยการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ที่จุด Baihui (GV 20) (MCAO+Laser acupuncture) มากกว่าหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery ที่ไม่ได้รับการรักษาใดๆ (MCAO alone) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส หลังจากได้รับการรักษาเป็นเวลา 14 วัน ($p < 0.05$ ทั้งหมดเทียบกับกลุ่ม MCAO alone) ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ catalase (CAT) ในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery ข้างขวา (n=5/กลุ่ม) ค่าที่แสดงเป็น mean±SEM, * $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม control และ # $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม MCAO alone

ในขณะที่ผลจากการศึกษาผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ SOD ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันหลอดเลือด middle cerebral artery ข้างขวา พบว่าการทำงานของเอนไซม์ SOD ของหนูที่ได้รับการรักษาด้วยการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ที่จุด Baihui (GV 20) (MCAO+Laser acupuncture) มากกว่าหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery ที่ไม่ได้รับการรักษาใดๆ (MCAO alone)

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส หลังจากได้รับการรักษาเป็นเวลา 14 วัน ($p < 0.05$ ทั้งหมดเทียบกับกลุ่ม MCAO alone) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 ผลของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ superoxide dismutase (SOD) ในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery ข้างขวา (n=5/กลุ่ม) ค่าที่แสดงเป็น mean±SEM, * $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม control และ # $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม MCAO alone

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ในภาวะสมองขาดเลือด (Cerebral ischemia) และในภาวะมีเลือดกลับมาเลี้ยงใหม่หลังจากขาดเลือดไปชั่วคราว จะมีการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ จำนวนมากส่งผลกระทบต่อระบบต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ทำให้เกิดการเสียสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระขึ้น และอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นจำนวนมากนี้ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และนำมาสู่การตายของเซลล์สมอง

โรคหลอดเลือดสมองมักทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในบริเวณที่ขาดเลือดไปเลี้ยงได้อย่างรุนแรง โดยผ่านการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส และกระบวนการ lipoygenase pathway และอนุมูลอิสระเหล่านี้เองที่ไปมีผลต่อการทำลายของเซลล์ประสาทที่เหนี่ยวนำโดยภาวะสมองขาดเลือด (Toyoda *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามบริเวณข้างเคียงที่เรียกว่า penumbra area ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเลือดไปเลี้ยงบางส่วนนั้นจะยังไม่ตายในทันทีแต่ก็จะได้รับผลกระทบที่ทำให้มีการเพิ่มอนุมูลอิสระ ซึ่งได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ไฮโดรอกซิล แรดิคัล และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพิ่มขึ้นในภาวะสมองขาดเลือด อาจเกิดเนื่องจากการลดประสิทธิภาพการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระ ประเภทเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ SOD, GPx และ CAT การเพิ่มขึ้นของ

อนุมูลอิสระเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการลดประสิทธิภาพการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลทำให้เซลล์ประสาทมีการตายมากขึ้น และส่งผลกระทบต่อการทำงานของสมองส่วนที่มีการตายของเซลล์ประสาท (Chan, 1996; Imai *et al.*, 2003) ซึ่งผลของการศึกษาฤทธิ์ของการฝังเข็มด้วยเลเซอร์ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ CAT และ SOD ในสมองหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันหลอดเลือด middle cerebral artery ข้างขวา ในครั้งนี้พบว่า หนูที่ได้รับการรักษาด้วยเลเซอร์ที่จุด Baihui (GV20) (MCAO+Laser acupuncture) มีการทำงานของเอนไซม์ CAT และ SOD ของสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery ไม่ได้รับการรักษาใดๆ (MCAO alone) ($p < 0.05$ ทั้งหมดเทียบกับกลุ่ม MCAO alone)

จากการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานว่า การฝังเข็มที่จุด Baihui (Gv20) สามารถลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับสมองในระดับเซลล์ได้ (Lin and Hsieh, 2010) นอกจากนั้นการฝังเข็มแบบกระตุ้นไฟฟ้าที่จุด Baihui (GV20) Yanglingquan (GB34) Taichong (LR3) Zusanli (ST36) และ Xuehai (SP10) สามารถ

ลดการเกิดอนุมูลอิสระ ลดระดับ MDA และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ SOD ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery (Chen *et al.*, 2008) นอกจากนี้ การฝังเข็มด้วยเลเซอร์ช่วยสามารถเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปยังสมองได้ (Litscher *et al.*, 2010) ช่วยลดภาวะความจำเสื่อม ลดภาวะเครียดออกซิเดชัน และการตายของเซลล์สมองในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคพาร์กินสัน (Wattanathorn *et al.*, 2014) และสามารถใช้เพื่อรักษาอาการต่างๆ เช่น อาการปวด (Madsen *et al.*, 2009) ช่วยเพิ่มการไหลเวียนเลือด ลดอาการปวดศีรษะ (Mark, 2012) เป็นต้น และเมื่อปี 2012 ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ฟามารโคฟงเจอร์โดยใช้ขิงที่จุด Baihui (GV20) ต่อภาวะสมองขาดเลือดในหนูขาวพบว่าฟามารโคฟงเจอร์โดยใช้ขิงที่จุด Baihui (GV20) สามารถลดระดับของ MDA และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ของ SOD, GPx และ CAT (Jittiwat and Wattanathorn, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้นี้ที่พบว่าหนูที่ได้รับการรักษาด้วยเลเซอร์ที่จุด Baihui (GV20) (MCAO+Laser acupuncture) มีการทำงานของเอนไซม์ CAT และ SOD ของสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด middle cerebral artery ไม่ได้รับการรักษาใดๆ (MCAO alone)

นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการนำเลเซอร์มาใช้ในการแพทย์กันอย่างแพร่หลายมากขึ้นทั้งทางด้านความงาม เช่น กำจัดขน รักษาสิว รักษารอยแผลเป็น รักษาเส้นเลือดขอด และการนำเลเซอร์มาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำเลเซอร์ความยาวคลื่น 810 นาโนเมตร สัญญาณเอาท์พุทของเครื่อง 150 มิลลิวัตต์ มาใช้ในการรักษาการบาดเจ็บของไขสันหลัง พบว่าสามารถช่วยในการฟื้นฟูการบาดเจ็บได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Wu *et al.*, 2009) และยังมีการทดลองในหนูสายพันธุ์ Sprague Dawley ที่ถูกเหนี่ยวนำเบาหวานหลังจากนั้นทำให้เป็นแผลที่แผ่นหลัง และใช้เลเซอร์ความยาวคลื่น 532, 633, 810 และ 980 นาโนเมตร ในการการรักษาแผล พบว่าเลเซอร์สามารถช่วยให้แผลที่เกิดหลังจากเบาหวานฟื้นฟูได้เร็วกว่าแผลของหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้จัดเป็นการสำรวจศักยภาพเบื้องต้นและความเป็นไปได้ของกลไกการทำงานของ การรักษาด้วยเลเซอร์ที่จุด Baihui (GV20) ในหนูแรทที่ถูก

เหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันหลอดเลือด middle cerebral artery ข้างขวาเท่านั้น ยังต้องการการศึกษาวิจัยถึงกลไกการออกฤทธิ์อื่นๆ ของการรักษาด้วยเลเซอร์ที่จุด Baihui (GV20) ในภาวะสมองขาดเลือดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณะแพทยศาสตรมหาวิทยาลัทยมหาสารคาม สำหรับทุนส่งเสริมและพัฒนารววิจัยสำหรับบุคลากร และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนารแพทย์ทางเลือกแบบบูรณาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับเครื่องมือปฏิบัติการวิจัย

References

- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986; 17 (3): 472-6.
- Bundhamchareon K, Teerawattananon Y, Vos T, *et al.* Burden of disease and injuries in Thailand. Nonthaburi: Ministry of Public Health; 2002.
- Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. 1996; 27(6): 1124-9.
- Chen CH, Hung HS, Hsu SH. Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. *Lasers Surg Med*. 2008; 40 (1): 46-54.
- Cherubini A, Polidori MC, Bregnocchi M, Pezzuto S, Cecchetti R, Ingegneri T, *et al.* Antioxidant profile and early outcome in stroke patients. *Stroke*. 2000; 31(10): 2295-300.
- Dong H, Fan YH, Zhang W, Wang Q, Yang QZ, Xiong LZ. Repeated electroacupuncture preconditioning attenuates matrix metalloproteinase-9 expression and activity after focal cerebral ischemia in rats. *Neurol Res*. 2009; 31 (8): 853-8.

- Imai H, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34 (1): 56-63.
- Jittiwat J, Wattanathorn J. Ginger pharmacopuncture improves cognitive impairment and oxidative stress following cerebral ischemia. *J Acupunct Meridian Stud.* 2012; 5 (6): 295-300.
- Kim, J. H. *et al.* *Electroacupuncture acutely improves cerebral blood flow and attenuates moderate ischemic injury via an endothelial mechanism in mice.* *PLoS One.* 2013; 8: e56736.
- Kirisattayakul W, Wattanathorn J, Tong-Un T, Muchimapura S, Wannanon P, Jittiwat J. Cerebroprotective effect of *Moringa oleifera* against focal ischemic stroke induced by middle cerebral artery occlusion. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 951415.
- Lin YW, Hsieh CL. Electroacupuncture at Baihui acupoint (GV20) reverses behavior deficit and long-term potentiation through N-methyl-D-aspartate and transient receptor potential vanilloid subtype 1 receptors in middle cerebral artery occlusion rats. *J Integr Neurosci.* 2010; 9(3):269-82.
- Litscher G, Huang T, Wang L, Zhang W. Violet laser acupuncture--part 1: Effects on brain circulation. *J Acupunct Meridian Stud.* 2010; 3 (4): 255-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.
- Madsen MV, Gotzsche PC, Hrobjartsson A. Acupuncture treatment for pain: systematic review of randomised clinical trials with acupuncture, placebo acupuncture, and no acupuncture groups. *BMJ.* 2009; 338: a3115.
- Mark Bovey. Acupuncture for headache. *Adv Clin Neurosci Rehabil.* 2012; 12 (4): 12-3.
- Mathers CD, Fat DM, Boerma JT, World Health Organization. *The Global Burden of Disease: 2004 Update.* Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95(2): 351-8.
- Orathai Khiaocharoen, Supasit Pannarunothai, Chairong Zungsontiporn. Cost of acute and subacute care for stroke patients. *J Med Assoc Thai.* 2012; 95(10): 1266-77.
- Shen EY, Chen FJ, Chen YY, Lin MF. Locating the Acupoint Baihui (GV20) Beneath the Cerebral Cortex with MRI Reconstructed 3D Neuroimages. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011: 362494.
- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 1996; 273 (5271): 59-63.
- Somsak Tiamkao. Development I-San stroke network. *J Thai Stroke Soc.* 2015; 14: 3-12.
- Toyoda K, Fujii K, Kamouchi M, Nakane H, Arihiro S, Okada Y, *et al.* Free radical scavenger, edaravone, in stroke with internal carotid artery occlusion. *J Neurol Sci.* 2004; 221 (1-2): 11-7.
- Wang Q, Wang F, Li X, Yang Q, Xu N, Huang Y, *et al.* Electroacupuncture pretreatment attenuates cerebral ischemic injury through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated inhibition of high-mobility group box 1 release in rats. *J Neuroinflammation.* 2012; 9: 24.

Wang WW, Xie CL, Lu L, Zheng GQ. A systematic review and meta-analysis of Baihui (GV20)-based scalp acupuncture in experimental ischemic stroke. *Sci Rep*. 2014; 4: 3981.

Wattanathorn J, Sitalangka C. Laser Acupuncture at HT7 Acupoint Improves Cognitive Deficit, Neuronal Loss, Oxidative Stress, and Functions of Cholinergic and Dopaminergic Systems in Animal Model of Parkinson's Disease. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014: 937601.

Wu X, Dmitriev AE, Cardoso MJ, Viers-Costello AG, Borke RC, Streeter J, *et al*. 810 nm Wavelength light: an effective therapy for transected or contused rat spinal cord. *Lasers Surg Med*. 2009; 41 (1): 36-41.

Yu YL, Liu L, Wang XT, Liu X, Liu XD, Xie L and Wang GJ. Modulation of glucagons-like peptide-1 release by berberine: in vivo and in vitro studies. *Biochem Pharmacol*. 2010; 79: 1000-6.