

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะขามป้อมและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท ต่อความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง Mouse Neuroblastoma

สดุดี รัตนจรัสโรจน์*, วารุณี จิรวัดนาพงศ์, ณัฐพร พลแสน, นิธิดา พลโคตร, ยุวดี เมตตาเมธา,
ประถม ทองศรีรักษ์

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี 11000

* ผู้รับผิดชอบบทความ: sadudee.r@dmcs.mail.go.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ภาวะเครียดจากการเกิดออกซิเดชันมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคความเสื่อมของประสาท ผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แรงและอาจใช้บรรเทาการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากภาวะดังกล่าวได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของผลมะขามป้อมต่อพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115

วิธีการศึกษา: นำน้ำคั้น (PE-J) สารสกัดด้วยน้ำ (PE-W) และสารสกัดด้วยเอทานอล (PE-E) จากผลมะขามป้อมมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยประเมินการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิลและซูเปอร์ออกไซด์ และศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทโดยเหนี่ยวนำให้เซลล์บาดเจ็บหรือตายจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตในเซลล์ N1E-115 แล้วตรวจวัดความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction นอกจากนี้ได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของผลมะขามป้อมโดยการเดิมสารยับยั้งเฉพาะต่อการส่งสัญญาณของเซลล์ผ่านวิถี Mitogen activated protein kinase (MAPK) และวิถี Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)

ผลการศึกษา: น้ำคั้น PE-J สารสกัด PE-W และ PE-E มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีมาก การสัมผัสกับสารสกัด PE-W และ PE-E ก่อนการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถปกป้องการตายของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ขณะที่การสัมผัสร่วมระหว่างแต่ละตัวอย่างกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่แสดงผลปกป้องเซลล์ และทั้งการสัมผัสก่อนและการสัมผัสร่วมกับทุกตัวอย่างยังไม่แสดงผลปกป้องการตายของเซลล์จากพิษของกลูตาเมต นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งเฉพาะที่วิถี PI3K มีผลต่อการแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-W และ PE-E จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่สารยับยั้งเฉพาะที่วิถี MAPK ไม่มีผลต่อฤทธิ์ดังกล่าว

อภิปรายผล: การแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะขามป้อมนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ การสัมผัสกับสารสกัด PE-W หรือ PE-E ก่อนการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นผลให้เกิดการปกป้องการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทอย่างน้อยเป็นผลมาจากคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน การยับยั้งที่วิถี PI3K มีผลทำให้ลดฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-W และ PE-E จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ชี้ให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทน่าจะออก

ฤทธิ์ผ่านกระบวนการส่งสัญญาณในวิถี PI3K

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยกลไกการออกฤทธิ์อาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน และกระบวนการส่งสัญญาณในวิถี PI3K ควรมีการศึกษาต่อไปในแบบจำลองความเสื่อมของเซลล์ประสาทอื่นหรือในสัตว์ทดลองเพื่อตรวจสอบฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ให้ชัดเจนก่อนนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป

คำสำคัญ: มะขามป้อม, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท, พิษต่อเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, พิษต่อเซลล์ประสาทจากกลูตามेट

Antioxidant Activity of *Makham Pom* (*Phyllanthus emblica* L.) Fruit and Its Neuroprotective Effect on Hydrogen Peroxide and Glutamate-Induced Neurotoxicity in Mouse Neuroblastoma Cells

Sadudee Rattanajarasroj^{*}, Warunee Jirawattanapong, Nattaporn Polsan, Nithida Phonkot, Yuwadee Mettametha, Pratom Tongsrirak

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand

^{*}Corresponding author: sadudee.r@dmisc.mail.go.th

Abstract

Introduction and Objective: Oxidative stress has been implicated in pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Phyllanthus emblica* L. (*Makham Pom* in Thai) fruit has potent antioxidant activity and may be used to alleviate oxidative stress-induced neurodegenerative process. This study was designed to investigate the anti-oxidative and neuroprotective activities of *P. emblica* fruits on hydrogen peroxide (H₂O₂) and glutamate-induced neurotoxicity in N1E-115, mouse neuroblastoma cell cultures.

Methods: *P. emblica* fruit juice (PE-J), water extract (PE-W) and ethanol extract (PE-E) were used in this study. All samples were evaluated for antioxidative activity using hydroxyl and superoxide scavenging assay. The neuroprotective activity was investigated using hydrogen peroxide (H₂O₂) and glutamate-induced neurotoxicity in N1E-115 cells. Cell viability was evaluated using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. Moreover, we also determined the protective effect of *P. emblica* fruits mediated via mitogen activated protein kinase (MAPK) or phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway. Inhibitors of intracellular signaling cascade were used in this study.

Results: PE-J, PE-W and PE-E exhibited efficient antioxidant activities. Pre-exposure of cultured neurons with PE-W or PE-E before H₂O₂ exposure could protect cell injury from H₂O₂ while co-exposure of cultured neurons to H₂O₂ with each sample did not show this beneficial effect. Both pre-exposure and co-exposure with all samples did not prevent glutamate-induced neurotoxicity in cultured neurons. In addition, PI3K inhibitor prevented PE-W and PE-E-induced neuroprotection, but MAPK inhibitor failed to counteract their protective effects.

Discussion: *P. emblica* fruits exhibited efficient antioxidant activities which are consistent with previous studies. Pre-exposure of cultured neurons with PE-W or PE-E before H₂O₂ exposure could protect cell injury from H₂O₂. It is possible that the protective effect might at least partly result from their antioxidative properties. PI3K inhibitor prevented PE-W and PE-E-induced neuroprotection against H₂O₂, suggesting that the neuroprotective

mechanisms might involve PI3K signaling pathway.

Conclusion and Recommendation: This study indicated that *P. emblica* fruit extract showed the neuroprotective effect on H₂O₂-induced neurotoxicity. The neuroprotective mechanisms might partly involve an antioxidant property and PI3K signaling pathway. It is suggested that further studies on other degenerative models and animal models are required to clarify its efficacy and delineate the underlying mechanisms prior to the development as herbal health products.

Key words: Makham Pom (*Phyllanthus emblica* L.), antioxidant activity, neuroprotective activity, hydrogen peroxide-induced neurotoxicity, glutamate induced-neurotoxicity

บทนำและวัตถุประสงค์

ภาวะเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคจากการอักเสบเรื้อรัง โรคจากภาวะเมแทบอลิกซินโดรม ความดันโลหิตสูง เบาหวาน ไขมันสูง โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง เป็นต้น นอกจากนี้ oxidative stress ยังมีความเกี่ยวข้องกับโรคความเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases)^[1] ภาวะ oxidative stress เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระ (free radicals) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ทำให้มีปริมาณ free radicals หรือสารออกซิไดส์แรงสูง (reactive oxygen species, ROS) จำนวนมากเกินไปในขณะที่ปริมาณสาร antioxidant มีไม่เพียงพอ ส่งผลให้เกิดการทำลายแบบออกซิเดชัน มีการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน เยื่อหุ้มเซลล์ (lipid peroxidation) และโมเลกุลอื่น ๆ ทำให้เซลล์ประสาทบาดเจ็บหรือตายและก่อให้เกิด neurodegenerative diseases ตามมา^[2-3] เช่น โรคอัลไซเมอร์ (alzheimer's disease), โรคพาร์กินสัน (parkinson's disease), huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, neuroinflammatory disorder เป็นต้น โรคเรื้อรัง

นี้ส่งผลให้การทำงานของสมองด้อยลงจากเดิมจนมีผลกระทบต่อการทำงาน การใช้ชีวิตประจำวัน และคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยและครอบครัว จากงานวิจัยพบว่าสาร antioxidants สามารถยับยั้งการเกิด ROS และอาจป้องกันหรือชะลอการเกิดพยาธิสภาพของ neurodegenerative diseases จากภาวะ oxidative stress ได้^[3-4] ดังนั้น การศึกษานี้จึงสนใจที่จะศึกษาสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดี เพื่อช่วยลดภาวะ oxidative stress และอาจสามารถป้องกันหรือชะลอการเสื่อมของเซลล์ประสาทได้

มะขามป้อม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus emblica* L. จัดอยู่ในวงศ์ Phyllanthaceae เป็นไม้ต้นผลัดใบ ใบเป็นใบเดี่ยวขนาดเล็กเรียงสลับกัน ดอกออกเป็นกระจุกตามซอกใบ เป็นดอกแยกเพศอยู่ร่วมต้นเดียวกัน ดอกเพศผู้มักอยู่บริเวณโคนกิ่ง มีเกสรเพศผู้ 3 อัน ส่วนดอกเพศเมียพบตามปลายกิ่ง ผลเป็นผลทรงกลมคล้ายผลเมล็ดเดี่ยวแข็ง ขนาด 2-3 เซนติเมตร มะขามป้อมกระจายพันธุ์ตั้งแต่ภูมิภาคเอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประเทศจีน ในประเทศไทยพบได้ทั่วทุกภูมิภาคตามป่าเบญจพรรณ (Figure 1)^[5]



Figure 1 The tree, flowers and fruits of *Phyllanthus emblica* (Linn.)

มะขามป้อมเป็นแหล่งที่สำคัญของวิตามินซีและกรดอะมิโน ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ทุกส่วนโดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนของผล^[6] ผลมะขามป้อมมีสรรพคุณตามตำรายาไทย ดังนี้ เนื้อผลแห้ง: รสเปรี้ยว ฝาดขม ช่วยขับเสมหะ ทำให้ชุ่มคอ เป็นยาฝาดสมาน แก้กิดสีดวง แก้บิด ท้องเสีย ใช้ร่วมกับธาตุเหล็กแก้ดีซ่าน และช่วยย่อยอาหาร ยางจากผล: รสเปรี้ยวฝาดขม ช่วยย่อยอาหาร ขับปัสสาวะ ใช้เป็นยาแก้ไอ^[7] นอกจากนี้ มะขามป้อมยังเป็นหนึ่งในสามสมุนไพรในตำรับยาไทย จัดอยู่ใน “พิภดตรีผลา” ประกอบด้วยส่วนผลของสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ สมอไทย (*Terminalia chebula*) สมอพิเภก (*Terminalia belerica*) และมะขามป้อมในปริมาณเท่ากันโดยน้ำหนัก สรรพคุณแก้ปิตตะ วาตะ เสมหะ ในกองธาตุ กองฤดู กองอายุ และกองสมุฏฐาน ใช้ในการบำรุงร่างกาย ชะลอวัย และใช้เป็นยาอายุวัฒนะ^[7-8]

จากบัญชียาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ ใช้ผลมะขามป้อมเป็นส่วนประกอบหนึ่งในยาแก้ไอผสมมะขามป้อม ยาแก้ไอตรีผลา ยาอำมฤควาที ซึ่งเป็นยาในกลุ่มโรคระบบทางเดินหายใจ บรรเทาอาการไอและขับเสมหะ^[9]

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในผลมะขามป้อม ได้แก่ สารกลุ่มแทนนิน (tannins) เช่น emblicanin-A, emblicanin-B, punigluconin, pedunculagin, chebulagic acid สารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) เช่น phyllantine, phyllantidine, phyllembein สารกลุ่มฟีนอล (phenols) เช่น gallic acid, ellagic acid, methyl gallate สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เช่น quercetin, kaempferol, rutin, isocorilagin^[10-11] เนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบที่มีส่วนของโพลีฟีนอล ได้แก่ gallic acid, ellagic acid วิตามินซี สารกลุ่มฟลาโวนอยด์

และสารกลุ่มแทนนิน ส่งผลให้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี และผลมะขามป้อมอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการมากมาย เช่น กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน โยอาหาร นอกจากนี้ ยังประกอบไปด้วยแร่ธาตุและวิตามินต่างๆ เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก กรดนิโคตินิก วิตามินซี เป็นต้น^[11-12]

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ต่างๆ เช่น ต้านเชื้อจุลินทรีย์^[13-15] ต้านอนุมูลอิสระ^[16-18] ต้านอักเสบ^[18-20] ลดไข้ แก้ปวด^[21-22] ด้านไอ^[23] ต้านมะเร็ง^[24-25] ต้านเบาหวาน^[26-29] ลดไขมันในเลือดและป้องกันการเกิดโรคหัวใจ^[30-32] ปกป้องกระเพาะอาหาร^[33] ปกป้องไต^[34] ปกป้องตับ^[35-37] ป้องกันหรือชะลอการเกิดมะเร็ง^[38-39] ปกป้องรังสี^[40] ปรับภูมิคุ้มกัน^[41-42] นอกจากนี้ ยังมีรายงานฤทธิ์ปกป้องสมองและเสริมความจำของผลมะขามป้อม Mathew และ Subramanian^[43] พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากผลมะขามป้อมยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ($IC_{50} < 100 \mu g/mL$) ทำให้ปริมาณ acetylcholine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญต่อการเรียนรู้และความจำเพิ่มขึ้น และยังพบว่าสารสกัดนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($IC_{50} < 10 \mu g/mL$) โดยทดสอบด้วยวิธี 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical assay Uddin และคณะ^[44] รายงานว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากผลมะขามป้อมสามารถลดฤทธิ์เอนไซม์ AChE เพิ่มระดับสารต้านอนุมูลอิสระในสมองและลด lipid peroxidation และยังมีผลทำให้พฤติกรรมการเรียนรู้และความจำของหนูแรดดีขึ้น สาร tannin ที่แยกจากผลมะขามป้อมสามารถลดภาวะสูญเสียความจำจาก aluminum chloride ในสมองส่วน hippocampus และ cortex ของหนูแรด^[45-46] โดยยับยั้งเอนไซม์ AChE ลด oxida-

tive stress และ apoptotic markers และยังลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ และสาร tannin ยังปกป้องพิษของ aluminum chloride ในสมองส่วน cerebellum ของหนูแรด โดยยับยั้งเอนไซม์ AChE และลดการแสดงออกของ apoptotic markers^[47] ส่วนสกัดย่อยที่มีแทนนินสูงของผลมะขามป้อมสามารถปกป้องการสูญเสียความจำจากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารที่มีคอเลสเตอรอลและเกลือสูงในหนูแรด โดยลดภาวะ oxidative stress ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการรู้คิดบกพร่อง (cognitive impairment) ในหนูแรด ทำให้ลดความบกพร่องในเรื่องการเรียนรู้และความจำโดยออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นวิถี Nrf2-ARE^[48] และยังทำให้ระดับโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ลดลง ลดการตายของเซลล์ประสาทโดยออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้งวิถี NF- κ B^[49] นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากผลมะขามป้อมปกป้องการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ประสาท neuroblastoma^[50] และสารสกัดจากผลมะขามป้อมสามารถลดการตายของเซลล์จากพิษของกลูตาเมตในเซลล์ประสาท pheochromocytoma^[51]

เนื่องจากมะขามป้อมเป็นพืชสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ ซึ่งนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ยาหลายชนิด ผลมะขามป้อมมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ที่น่าสนใจ ผลมะขามป้อมมีวิตามินซีในปริมาณสูงและยังมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี มีหลักฐานสนับสนุนว่าสาร antioxidants อาจะป้องกันหรือชะลอการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่เป็นผลมาจาก oxidative stress ได้^[3-4] อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของผลมะขามป้อมไม่เพียงพอ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผล

มะขามป้อมโดยประเมินการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล และซูเปอร์ออกไซด์ และศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทโดยการเหนี่ยวนำให้เซลล์บาดเจ็บหรือตายจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมตในเซลล์ประสาท neuroblastoma, N1E-115 แล้วตรวจวัดความอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reduction นอกจากนี้ ได้ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์โดยการเติมสารยับยั้งเฉพาะต่อการส่งสัญญาณของเซลล์ผ่านวิถี Mitogen activated protein kinase (MAPK) และวิถี Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ในเซลล์ N1E-115

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 วัตถุดิบสมุนไพร: เก็บรวบรวมตัวอย่างมะขามป้อมจากพื้นที่จังหวัดจันทบุรีเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการศึกษา และตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีทาง (chemical identification) ของผลมะขามป้อมตามวิธีในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia)^[52]

1.2 การเตรียมสมุนไพร: นำส่วนที่ใช้ คือ ผลมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ แยกหั่นผลมะขามป้อมเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C จากนั้นบดเป็นผงหยาบ และเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิทก่อนนำไปเตรียมสารสกัด

1.3 การเตรียมสารสกัด: นำผงสมุนไพรแห้งของผลมะขามป้อมตั้งต้นปริมาณ 100 กรัม มาเตรียมดังนี้

1) การเตรียมน้ำคั้น: บีบหรือคั้นใน

น้ำ กรอง และนำไปทำให้เข้มข้นภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator (rotary vacuum evaporator, Büchi, Japan) และทำให้แห้งโดยใช้ lyophilizer (Labconco, USA) ได้น้ำคั้นจากผลมะขามป้อม (PE-J) โดยมีร้อยละของปริมาณสารที่คั้นได้เท่ากับ 5.13 (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก)

2) การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำ: ต้มกลั่นในน้ำ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง กรอง และนำไปทำให้เข้มข้นภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วทำให้แห้งโดยใช้ lyophilizer ได้สารสกัดด้วยน้ำจากผลมะขามป้อม (PE-W) โดยมีร้อยละของปริมาณสารที่สกัดได้เท่ากับ 29.01 (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก)

3) การเตรียมสารสกัดด้วยเอทานอล: ต้มกลั่นในเอทานอล 95% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง กรอง และนำไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้ lyophilizer ได้สารสกัดด้วยเอทานอลจากผลมะขามป้อม (PE-E) โดยมีร้อยละของปริมาณสารที่สกัดได้เท่ากับ 18.24 (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การควบคุมคุณภาพสารสกัด

การควบคุมคุณภาพทางเคมีของน้ำคั้น PE-J สารสกัด PE-W และสารสกัด PE-E ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดผิบบาง (thin layer chromatography; TLC) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ตรวจสอบลักษณะของโครมาโทแกรม (chromatogram) ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และทำปฏิกิริยากับสารละลาย Iron (III) chloride TS

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ:

1) วิเคราะห์ด้วยวิธีดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical scavenging assay) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Halliwell และคณะ^[53] ดังนี้ reaction mixture ประกอบด้วย deoxyribose 1 มิลลิโมลาร์ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 ไมโครโมลาร์ H_2O_2 100 ไมโครโมลาร์ ascorbic acid 100 ไมโครโมลาร์ และสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 20-400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือสารมาตรฐาน trolox 40-400 ไมโครโมลาร์ ผสมสารให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย butylate hydroxytoluene 100 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำ TBARS assay โดยเติม trichloroacetic acid 2.8% และ thiobarbituric acid 1% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ผลการทดลองที่ได้นำไปคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดหรือสารมาตรฐาน การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจะพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 (inhibitory concentration 50%, IC_{50}) และค่า trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) ซึ่งเป็นค่าที่บอกความแรงของสารสกัดสมุนไพรในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นจำนวนเท่าเมื่อเทียบกับอนุพันธ์วิตามินอี (trolox) ต่อกรัมของตัวอย่างสารสกัด

2) วิเคราะห์ด้วยวิธีดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical scavenging assay) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nishikimi และคณะ^[54] ดังนี้ reaction mixture ประกอบด้วย nitroblue

tetrazolium 258 ไมโครโมลาร์ nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 996 ไมโครโมลาร์ และ phenazine methosulfate (PMS) 16.2 ไมโครโมลาร์ และสารสกัดสมุนไพรหรือสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเตรียมสารทุกตัวใน phosphate buffer (10 mM, pH 7.4) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ 562 นาโนเมตร ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าร้อยละของ activity เทียบกับกลุ่มที่เกิดปฏิกิริยา 100% คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์เป็นร้อยละของการยับยั้ง แล้วนำมา plot กราฟเพื่อหาค่า IC_{50} เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

2.3 การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

1) การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง mouse neuroblastoma, N1E-115 (Cat. No. CRL-2263) [American Type Culture Collection (ATCC), USA] passage number 24-34 ซึ่งเป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ ชนิดควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะ CO_2 5% ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM-high glucose; Sigma-Aldrich, USA, Cat.No.D1152) ที่มี sodium bicarbonate 3.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร fetal bovine serum 10% (FBS; Hyclone, USA) และยาปฏิชีวนะ penicillin G sodium (100 ยูนิต/มิลลิลิตร) และ streptomycin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นาน 5-7 วัน หลังจากนั้นย่อยเซลล์ด้วย trypsin-EDTA 0.25% ได้ cell suspension แล้วนำไปปั่นโดยใช้เครื่องปั่นชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Sorval RT7, USA) ด้วยความเร็ว 1,200

รอบก่อนที่ อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ cell pellet มาเติม DMEM ที่มี FBS 10% และทำเป็น cell suspension นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย hemocytometer โดยวิธี trypan blue exclusion และนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (passage) โดยแบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน และเพาะเลี้ยงขยายดังที่กล่าว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง หรือเมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนประมาณ 80-90% ของพื้นที่ขวด

2) การเตรียมเซลล์สำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาท

2.1) การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์: เลี้ยงเซลล์ N1E-115 ใน 48 well plate (flat-shape) โดยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ภายใต้สภาวะ CO_2 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นแบบไม่มีซีรัม ซึ่งประกอบด้วย DMEM-high glucose (Sigma-Aldrich, USA, Cat.No. D1152) ที่มี sodium bicarbonate 3.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะ และ N2 supplement ได้แก่ sodium selenite (Na_2SeO_3) 30 นาโนโมลาร์ human transferrin 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร bovine insulin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร progesterone 20 นาโนโมลาร์ และ putrescin 100 ไมโครโมลาร์ นำเซลล์เพาะเลี้ยงนี้ไปใช้ในการทดลองหลังจากอายุได้ 48 ชั่วโมง

2.2) การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากกลูตาเมต: เลี้ยงเซลล์ N1E-115 ใน 48 well plate (flat-shape) ที่เคลือบด้วยสาร poly-D-lysine 100

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 4×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ภายใต้สภาวะ CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM-high glucose (Sigma-Aldrich, USA, Cat.No. D1152) ที่มี sodium bicarbonate 3.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร FBS 0.5% และ ยาปฏิชีวนะ แล้วเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 1.5% ในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เซลล์เปลี่ยนสภาพ (differentiation) ภายใต้สภาวะที่มีซีรัมต่ำและมี DMSO^[55-56] เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 96 ชั่วโมง จึงนำเซลล์ไปใช้ในการทดลอง

3) การทดสอบในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์^[57]

3.1) การทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

เจือจางสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30% (เทียบเท่ากับ 9.794 โมลาร์) ด้วย Phosphate Buffered Saline (DPBS; Sigma-Aldrich, USA) ที่มี MgCl_2 0.100 กรัม/ลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ นำเซลล์ N1E-115 (3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครโมลาร์ ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุมแล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม PBS ในปริมาณเท่ากัน หลังจากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction

3.2) การทดสอบผลของน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W และ PE-E ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

ละลายน้ำคั้น PE-J และสารสกัด PE-W ใน sterile distilled water และละลายสารสกัด PE-E ใน DMSO บริสุทธิ์ แล้วเจือจางด้วย sterile distilled

water เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ที่ต้องการ (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) นำเซลล์ N1E-115 (3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติมน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W หรือ PE-E ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุมแล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาณเท่ากัน ในการทดสอบผลของน้ำคั้น PE-J และสารสกัด PE-W หรือ เติม DMSO 2.5% ในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด PE-E หลังจากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction

3.3) การทดสอบผลของน้ำคั้น PE-J สารสกัด PE-W และ PE-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำเซลล์ N1E-115 (3×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติมน้ำคั้น PE-J หรือ สารสกัด PE-W ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือเติมสารสกัด PE-E ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาณเท่ากันในการทดสอบผลของน้ำคั้น PE-J และสารสกัด PE-W หรือเติม DMSO 2.5% ในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด PE-E พร้อมกับเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 ไมโครโมลาร์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุม และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกกลุ่มการทดสอบให้เติมน้ำคั้นหรือสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าว เป็นเวลา 24

ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 ไมโครโมลาร์ และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction กรณีพบว่าตัวอย่างมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจะทดสอบต่อโดยการเติมสารยับยั้งเฉพาะต่อการส่งสัญญาณของเซลล์

3.4) การทดสอบผลของสารยับยั้งเฉพาะ MEK inhibitor (PD 98059) หรือ PI3K inhibitor (LY 294002) ต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-W และ PE-E จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (การสัมผัสสารสกัดจากผลมะขามป้อมก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์)

ละลาย PD 98059 และ LY 294002 ใน DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เก็บเป็น stock solutions ที่อุณหภูมิ -20°C และเจือจางด้วย DMSO เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ นำเซลล์เพาะเลี้ยง N1E-115 (3×10^4 cell/cm²) อายุ 48 ชั่วโมง มาเติมสาร PD 98059 (30 ไมโครโมลาร์) หรือ (LY 294002 40 ไมโครโมลาร์) หรือเติม vehical เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเติมสารสกัด PE-W ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือ PE-E ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับเติมสารยับยั้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 ไมโครโมลาร์ พร้อมกับเติมสารยับยั้ง และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction

4) การทดสอบในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากกลูตาเมต^[58]

4.1) การทดสอบความเป็นพิษของกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

ละลายกลูตาเมตและไกลซีนใน sterile PBS (DPBS ที่ปราศจาก $MgCl_2$) แล้วเจือจางด้วย PBS เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการ นำเซลล์ N1E-115 (4×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติมกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ พร้อมกับเติมไกลซีนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม หลังจากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction

4.2) การทดสอบผลของน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W และ PE-E ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

นำเซลล์ N1E-115 (4×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติมน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W หรือ PE-E ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาณเท่ากันในการทดสอบผลของน้ำคั้น PE-J และสารสกัด PE-W หรือเติม DMSO 2.5% ในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด PE-E หลังจากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction

4.3) การทดสอบผลของน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W และ PE-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากกลูตาเมต

นำเซลล์ N1E-115 (4×10^4 cell/cm²)

อายุ 96 ชั่วโมง แต่ละหลุมมาเติมน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W หรือ PE-E ที่ความเข้มข้น 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมให้เติม sterile distilled water ในปริมาณเท่ากันในการทดสอบผลของน้ำคั้น PE-J และสารสกัด PE-W หรือเติม DMSO 2.5% ในปริมาณเท่ากัน (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 0.1%) ในการทดสอบผลของสารสกัด PE-E พร้อมกับเติมกลูตาเมต 50 มิลลิโมลาร์ และไกลซีน 2 มิลลิโมลาร์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุม และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกกลุ่มการทดสอบให้เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ก่อนเติมกลูตาเมตและไกลซีน และเติม PBS ในปริมาณเท่ากันในเซลล์กลุ่มควบคุม แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจวัด cell viability ด้วยวิธี MTT reduction

5) การประเมินคุณภาพ และการตรวจวัดความอยู่รอดของเซลล์

5.1) การประเมิน cell morphology

ตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope, Axiovert 200, Zeiss, Germany) โดยใช้เทคนิค phase contrast

5.2) การตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT reduction assay

ตรวจวัด MTT reduction ซึ่งบ่งบอกความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี colorimetric โดยดัดแปลงจากวิธีของ Mosmann (1983)^[59] ดังนี้ เติมน้ำละลาย MTT 10 ไมโครลิตร (5 มิลลิกรัม/

มิลลิลิตรใน PBS) ลงในเซลล์ของแต่ละหลุม (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติม DMSO 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ดูดสารละลายของแต่ละหลุมใส่ใน 96 well plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Multi-detection microplate reader (Synergy™ HT, Biotex, USA) ที่ความยาวคลื่น 570/620 นาโนเมตร ค่า MTT reduction แสดงในรูปของร้อยละเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ (untreated control) ซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับสารหรือสมุนไพร $\times 100$) / ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1) การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ

ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of the mean, SEM) โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 3 การทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน ($n = 3$) การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน ใช้ unpair *t*-test ค่า *p* ที่น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2) การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

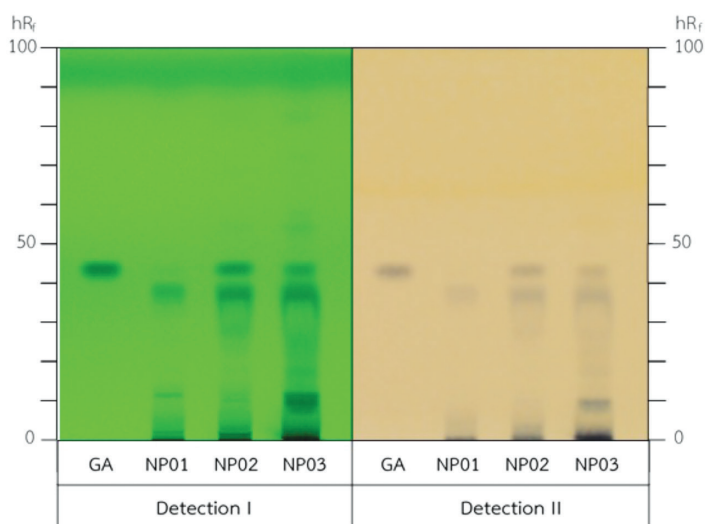
ปกป้องเซลล์ประสาท

ข้อมูลทุกค่านำเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SEM) โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลมาจาก 6 ตัวอย่าง ($n = 6$) ที่เป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตัวอย่างทำสามซ้ำ การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยมากกว่า 2 กลุ่ม ใช้ analysis of variance (ANOVA) การเปรียบเทียบข้อมูลที่แตกต่างกัน กรณีความแปรปรวนของทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันใช้ Scheffe multiple comparisons และแตกต่างกันใช้ Tamhane's T2 multiple comparisons ค่า *p* ที่น้อยกว่า 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

1. ผลการควบคุมคุณภาพสารสกัด

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของผลมะขามป้อมโดยวิธี TLC พบแถบสีดำของน้ำคั้น PE-J สารสกัด PE-W และ PE-E ตรงกับแถบของสารละลายมาตรฐาน gallic acid จาก chromatogram พบว่าสารสกัด PE-W มีความเข้มของแถบมากกว่าสารสกัด PE-E ขณะที่น้ำคั้น PE-J มีแถบสีจาง ๆ (Figure 2) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณ gallic acid มากกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล ส่วนน้ำคั้นมีปริมาณ gallic acid ในปริมาณน้อย



GA = gallic acid 1.5 mg/ml

NP01 = juice of *P. emblica* fruits (PE-J) 50 mg/ml

NP02 = water extract of *P. emblica* fruits (PE-W) 50 mg/ml

NP03 = ethanol extract of *P. emblica* fruits (PE-E) 50 mg/ml

Figure 2 TLC chromatogram of juice, water extract and ethanol extract from *P. emblica* fruits compared with gallic acid as standard

(A) detected under UV at 254 nm (Detection I)

(B) sprayed with Iron (III) chloride TS (Detection II)

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิลพบว่าน้ำคั้น PE-J สารสกัด PE-W และ PE-E ของผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิลตามความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.41 ± 4.26 , 10.98 ± 1.14 และ 10.37 ± 1.30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารมาตรฐาน trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 184.87 ± 26.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าผลมะขามป้อมต้านอนุมูลอิสระได้ดีมาก และในปริมาณที่แรงกว่า trolox โดยมีความแรงในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็น 24.95, 16.84 และ 17.83 เท่า เมื่อเทียบกับ trolox หรืออนุพันธ์วิตามินอี

(trolox equivalence/ α -tocopherol equivalent antioxidant capacity) ต่อกัมของตัวอย่างสารสกัดจากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของซูเปอร์ออกไซด์พบว่าน้ำคั้น PE-J สารสกัด PE-W และ PE-E ของผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของซูเปอร์ออกไซด์ตามความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.91 ± 0.62 , 20.02 ± 2.03 และ 18.08 ± 0.37 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารมาตรฐาน gallic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.71 ± 1.80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าผลมะขามป้อมต้านอนุมูลอิสระของซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีมากเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3.1 ผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เหนี่ยวนำให้เซลล์ N1E-115 ตายแบบ concentration dependent manner โดย cell viability ของกลุ่มที่สัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นในช่วง 100-500 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Figure 3a) จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ประสาทมีรูปร่างผิดปกติ โดยเซลล์มีลักษณะบวม หรือหดตัว หรือฝ่อเป็นซากเศษเซลล์ที่ตายแล้วปะปนกับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และ neurites มีความยาวสั้นลงและไม่มีความต่อเนื่อง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ความผิดปกตินี้เกิดขึ้นพร้อมกันกับการลดลงของ cell viability เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์ตายประมาณร้อยละ 50 จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในการทดลองต่อไป

3.2 ผลของมะขามป้อมต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: เมื่อเซลล์ N1E-115 สัมผัสกับน้ำคั้น PE-J สารสกัด PE-W และ PE-E ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5,

25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า MTT reduction ของเซลล์หลังสัมผัสกับน้ำคั้น PE-J เป็นร้อยละ 103.67, 103.21, 103.93, 99.51, 94.84, 78.96 และ 67.42 ตามลำดับ (Figure 3b) MTT reduction ของเซลล์หลังสัมผัสกับสารสกัด PE-W เป็นร้อยละ 103.31, 106.08, 104.48, 103.83, 89.04, 65.27 และ 63.05 ตามลำดับ (Figure 3c) และหลังสัมผัสกับสารสกัด PE-E เป็นร้อยละ 105.83, 106.31, 100.28, 97.63, 84.38, 64.31 และ 54.87 ตามลำดับ (Figure 3d) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) แสดงให้เห็นว่าน้ำคั้น PE-J ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีผลลด cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดลงร้อยละ 21.04 และ 32.58 ตามลำดับ และสารสกัด PE-W ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีผลลด cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดลงร้อยละ 34.73 และ 36.95 ตามลำดับ (Figure 3b และ Figure 3c) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) ส่วนสารสกัด PE-E ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีผลลด cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยลดลงร้อยละ 15.62, 35.69 และ 45.13 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) (Figure 3d)

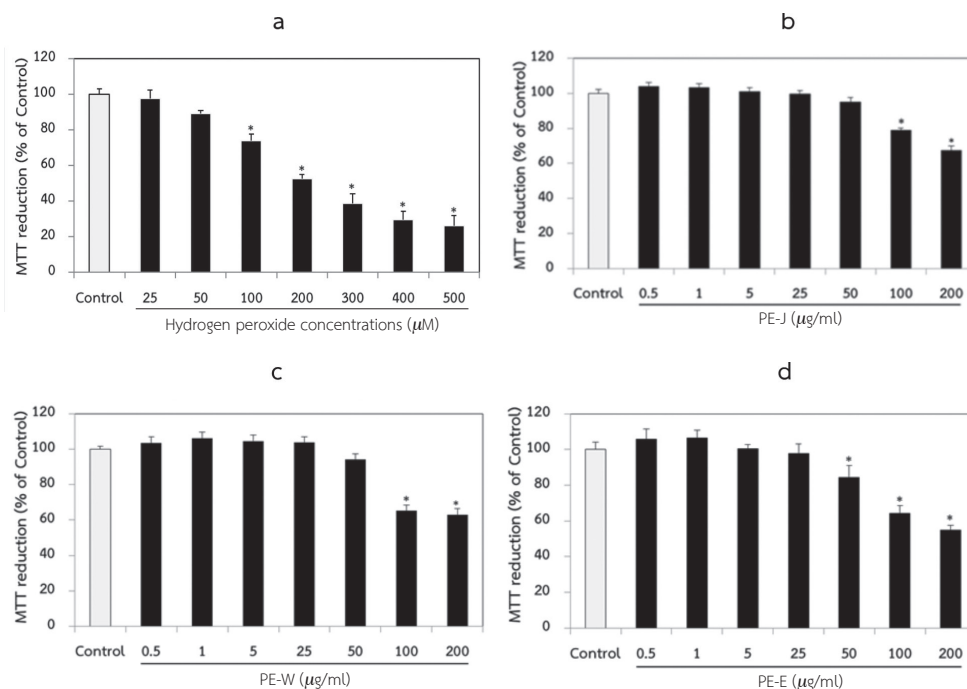


Figure 3 Effect of hydrogen peroxide, juice (PE-J), water extract (PE-W) and ethanol extract (PE-E) of *P. emblica* fruits on N1E-115 cell cultures

N1E-115 cells were cultured for 48 hours and then exposed to various concentrations of hydrogen peroxide (25–500 μ M) (a) for 24 hours or incubated with different concentrations of PE-J (b), PE-W (c) or PE-E (d) (0.5–200 μ g/ml) for 24 hours. After incubation, cell viability was determined by MTT reduction assay. Data are expressed as Mean $\pm$ SEM of six samples ($n = 6$) from independent experiments, each performed in triplicate.

*statistically significant difference from control cultures ($p < 0.05$)

3.3 ผลของน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W และ PE-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เมื่อให้เซลล์ N1E-115 สัมผัสกับน้ำคั้น PE-J และสารสกัด PE-W ที่ความเข้มข้น 0.1-50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือสัมผัสกับสารสกัด PE-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W และ PE-E ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง

MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (ไม่แสดงข้อมูล) แสดงให้เห็นว่าน้ำคั้นและสารสกัดจากผลมะขามป้อมที่ความเข้มข้นดังกล่าวเมื่อให้พร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถลดการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ เมื่อให้เซลล์ N1E-115 สัมผัสกับน้ำคั้น PE-J หรือสารสกัด PE-W ที่ความเข้มข้น 0.1-50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือเติมสารสกัด PE-E ที่ความเข้มข้น 0.05-25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ก่อนให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าน้ำ

คั้น PE-J ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (Figure 4a) ในขณะที่สารสกัด PE-W ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 19.40 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว (Figure 4b) และสารสกัด PE-E ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นร้อยละ 17.00 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่าง

เดียว (Figure 4c) ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าน้ำคั้น PE-J ที่ความเข้มข้น 0.1-50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ในขณะที่สารสกัด PE-W ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัด PE-E ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (Figure 4a ถึง Figure 4c)

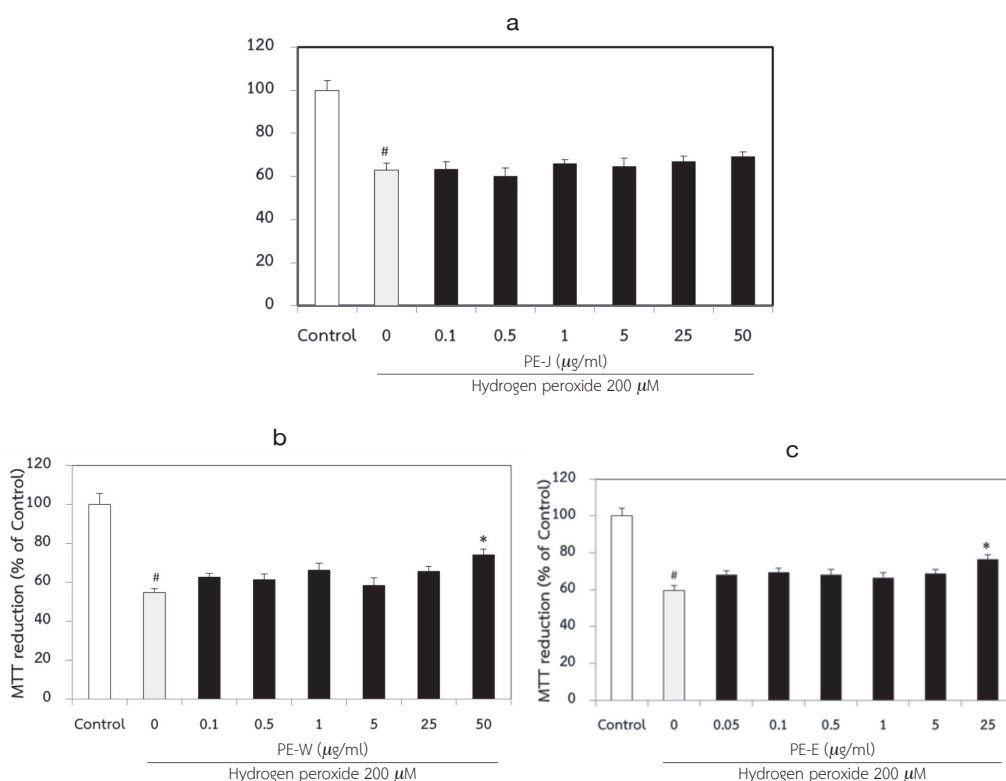


Figure 4 Effect of juice (PE-J), water extract (PE-W) and ethanol extract (PE-E) of *P. emblica* fruits on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in N1E-115 cell cultures

N1E-115 cells were cultured for 48 hours and then pretreated with PE-J (0.1–50 µg/ml) (a), PE-W (0.1–50 µg/ml) (b) or PE-E (0.05–25 µg/ml) (c) for 24 hours and further incubated with hydrogen peroxide (200 µM) for 24 hours. After incubation, cell viability was determined by MTT reduction assay. Data are expressed as Mean ± SEM of six samples (n = 6) from independent experiments, each performed in triplicate.

[#]statistically significant difference from control cultures ($p < 0.05$)

^{*}statistically significant difference from hydrogen peroxide-treated cultures ($p < 0.05$)

3.4 ผลของสารยับยั้งเฉพาะ MEK inhibitor (PD 98059) หรือ PI3K inhibitor (LY 294002) ต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-W และ PE-E จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การทดสอบว่ากลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-W และ PE-E เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณผ่านวิถี MAPK หรือวิถี PI3K หรือไม่ โดยเติมหรือไม่เติมสารยับยั้งเฉพาะ ได้แก่ MEK inhibitor (PD 98059) หรือ PI3K inhibitor (LY 294002) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการสัมผัสก่อน (เซลล์ประสาทสัมผัสกับมะขามป้อมก่อนให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) หลังจากนั้นเติมสารยับยั้งเฉพาะไปพร้อมกับการสัมผัสก่อนในเซลล์เพาะเลี้ยง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-W พบว่า PD 98059 (30 ไมโครโมลาร์) และ LY 294002 (40 ไมโครโมลาร์) ไม่มีผลต่อ MTT reduction สารสกัด PE-W (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถเพิ่ม cell viability

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้น 21.85% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว และพบว่า PD 98059 (30 มิลลิโมลาร์) ไม่มีผลต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-W ขณะที่ LY 294002 (40 มิลลิโมลาร์) มีผลต่อ cell viability โดยลดฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-W (Figure 5a) เมื่อทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-E พบว่า PD 98059 (30 ไมโครโมลาร์) และ LY 294002 (40 ไมโครโมลาร์) ไม่มีผลต่อ MTT reduction สารสกัด PE-E (25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สามารถเพิ่ม cell viability อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเพิ่มขึ้น 20.10% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว และพบว่า PD 98059 (30 มิลลิโมลาร์) ไม่มีผลต่อฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-E ขณะที่ LY 294002 (40 มิลลิโมลาร์) มีผลต่อ cell viability โดยลดฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-E (Figure 5b)

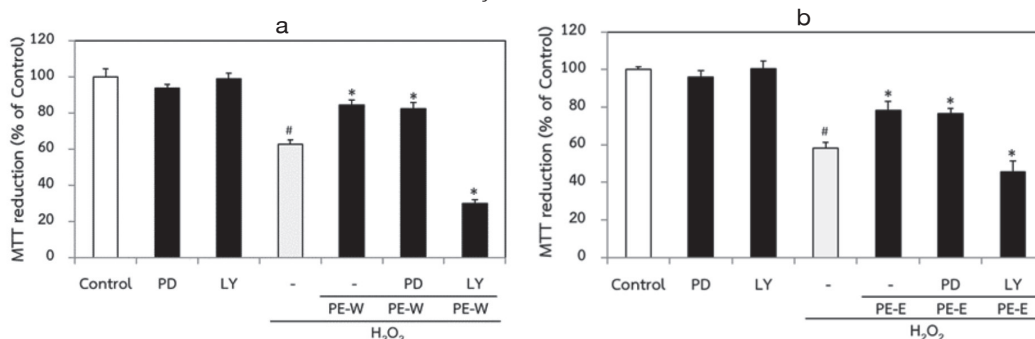


Figure 5 Effect of MEK inhibitor (PD 98059) or PI3K inhibitor (LY 294002) on neuroprotectivity of water extract (PE-W) and ethanol extract (PE-E) of *P. emblica* fruits against hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in N1E-115 cell cultures

N1E-115 cells were cultured for 48 hours and then pretreated with PD 98059 (30 μ M) or LY 294002 (40 μ M). Two hours later, PE-W (50 μ g/ml) (a) or PE-E (25 μ g/ml) (b) was added to the culture medium for an additional 24 hours. After pre-incubation, culture medium was changed and replaced with fresh medium containing hydrogen peroxide (200 μ M) for 24 hours. Then, cell viability was determined by MTT reduction assay. Data are expressed as Mean $\pm$ SEM of six samples ($n = 6$) from independent experiments, each performed in triplicate.

#statistically significant difference from control cultures ($p < 0.05$)

*statistically significant difference from hydrogen peroxide-treated cultures ($p < 0.05$)

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท ในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาท จากกลูตาเมต

4.1 ผลของกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง: พบว่ากลูตาเมตเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ concentration dependent manner โดย cell viability ของกลุ่มที่สัมผัสกับกลูตาเมตที่ความเข้มข้นในช่วง 25-100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Figure 6a) จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ประสาทลดลง เซลล์ประสาทมีรูปร่างผิดปกติ และ neurites มีความยาวสั้นลงและไม่มีความต่อเนื่อง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ความผิดปกตินี้เกิดขึ้นพร้อมกันกับการลดลงของ cell viability เนื่องจากกลูตาเมตที่ความ

เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ทำให้เซลล์ตายประมาณร้อยละ 50 จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในการทดลองต่อไป

4.2 ผลของมะขามป้อมต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ทำให้เปลี่ยนสภาพแล้ว: เมื่อให้เซลล์ differentiated N1E-115 สัมผัสกับน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W หรือ PE-E ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า MTT reduction ของเซลล์ประสาทไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%) แสดงให้เห็นว่าน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W และ PE-E ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อ cell viability ของเซลล์ประสาท (Figure 6b-Figure 6d)

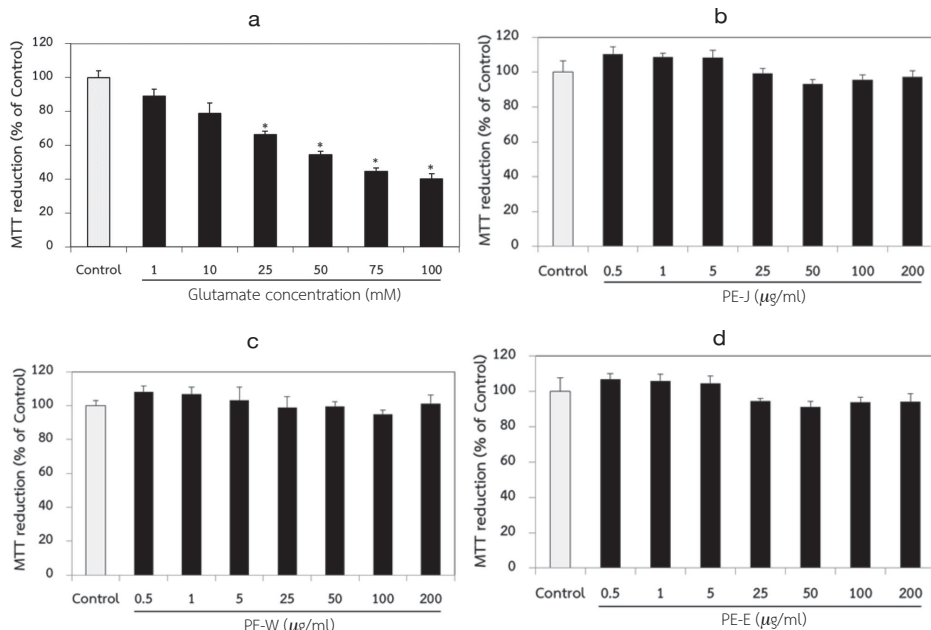


Figure 6 Effect of glutamate, juice (PE-J), water extract (PE-W) and ethanol extract (PE-E) of *P. emblica* fruits on N1E-115 cell cultures

Differentiated N1E-115 cells were cultured for 96 hours and then exposed to various concentrations of glutamate (1–100 mM) (a) for 24 hours or incubated with different concentrations of PE-J (b), PE-W (c) or PE-E (d) (0.5–200 µg/ml) for 24 hours. After incubation, cell viability was determined by MTT reduction assay. Data are expressed as Mean $\pm$ SEM of six samples ($n = 6$) from independent experiments, each performed in triplicate.

*statistically significant difference from control cultures ($p < 0.05$)

4.3 ผลของน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W และ

PE-E ต่อความเป็นพิษของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก

กลูตาเมต : เมื่อทำให้เซลล์ differentiated N1E-115 สัมผัสกับน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W หรือ PE-E ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พร้อมกับหรือก่อนให้กลูตาเมตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W และ PE-E ไม่มีผลต่อ MTT reduction เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่แสดงข้อมูล) แสดงให้เห็นว่าน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W และ PE-E ที่ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถลดการบาดเจ็บหรือการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากกลูตาเมตได้

อภิปรายผล

ภาวะ oxidative stress จากอนุมูลอิสระเกินเป็นสาเหตุสำคัญของการทำลายเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดความเสียหายและความเสื่อมของเซลล์ ก่อให้เกิด neurodegenerative diseases ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้แบบจำลองที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ได้แก่ trolox และ gallic acid จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าน้ำคั้นและสารสกัดจากผลมะขามป้อมต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีมากในปริมาณที่แรงกว่า trolox และผลมะขามป้อมยังสามารถต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีมากเช่นเดียวกับ gallic acid การแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะขามป้อมนี้สอดคล้องกับรายงานที่มีผู้วิจัยมาแล้ว^[16-18] ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

จากการควบคุมคุณภาพทางเคมีโดยใช้เทคนิค TLC และใช้ gallic acid เป็นสารเปรียบเทียบนั้นพบว่าผลมะขามป้อมมีสาร gallic acid ซึ่งเป็นสารประ-

กอบฟีโนลิก ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานอื่นที่พบว่า gallic acid เป็นหนึ่งในสารฟลาโวนอยด์ที่พบในผลมะขามป้อมและเป็นตัวหลักที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงใช้ปริมาณ gallic acid เป็นตัวชี้วัดของศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระในผลมะขามป้อมได้^[17] ดังนั้นการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะขามป้อมนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากสารกลุ่มฟีนอลที่พบในผลมะขามป้อม ส่วนการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีโดยวิธี TLC ที่พบว่าน้ำคั้น PE-J (แถบสีจาง ๆ) มีปริมาณ gallic acid น้อยกว่าสารสกัด PE-W และ PE-E แต่น้ำคั้น PE-J ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้แรงกว่าสารสกัด PE-W และ PE-E อาจเป็นไปได้ว่าน้ำคั้น PE-J อาจมีสารตัวอื่นในกลุ่มแทนนินหรือกลุ่มฟีนอลหรือกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นส่วนประกอบร่วมด้วยจึงเสริมฤทธิ์กันทำให้แสดงต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า ซึ่งในการศึกษานี้ไม่ได้วัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจึงไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความแรงในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผลมะขามป้อมได้

งานวิจัยรายงานว่าสาร antioxidants ที่มีศักยภาพในการดักจับอนุมูลอิสระและต้านการเกิด oxidative stress อาจจะป้องกันหรือชะลอการเกิดพยาธิสภาพจากการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่เป็นผลมาจาก oxidative stress ได้^[3-4] และการศึกษาที่พบว่าสารสกัดจากผลมะขามป้อมแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้น กลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทอย่างน้อยส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารกลุ่มฟีนอลที่พบในผลมะขามป้อมทำให้สามารถลดการตายของเซลล์ประสาทได้ จากผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ที่พบว่า สารสกัด PE-W แสดงฤทธิ์

มากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัด PE-E และ PE-J ตามลำดับ ผลนี้มีความสอดคล้องกับผลการปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่พบว่าสารสกัด PE-W แสดงฤทธิ์มากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัด PE-E ในขณะที่ น้ำคั้น PE-J ไม่แสดงฤทธิ์ ดังกล่าว ความสอดคล้องกันนี้มีความสัมพันธ์กับผลการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณ gallic acid มากกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล ส่วนน้ำคั้นมีปริมาณ gallic acid ในปริมาณน้อย การแสดงฤทธิ์ดังกล่าวอาจขึ้นกับปริมาณของสารกลุ่มฟีนอล หากมีการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic contents) ในสารสกัดจากผลมะขามป้อมร่วมด้วยจะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความแรงในการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดสมุนไพร

การสัมผัสกับสารสกัดจากผลมะขามป้อมก่อนเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นผลให้เกิดการปกป้องการตายของเซลล์ประสาทเฉพาะเลี้ยงที่เกิดจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของผลมะขามป้อมมีผลต่อเซลล์ประสาทในแง่ของการป้องกันการเกิดพิษ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการแสดงฤทธิ์โดยให้สารสกัดจากผลมะขามป้อมเข้าสู่เซลล์ก่อนแล้วจึงเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลัง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sukma และคณะ^[50] ที่พบว่าการสัมผัสกับสารสกัดจากผลมะขามป้อมก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถปกป้องการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ประสาท neuroblastoma, NG108-15 ได้ ในขณะที่การสัมผัสระหว่างสารสกัดจากผลมะขามป้อมพร้อมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นไม่มีผล

ต่อการปกป้องการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสดงว่าฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของผลมะขามป้อมไม่ได้เกิดจากการออกฤทธิ์โดยตรงต่อความเป็นพิษที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนการสัมผัสของเซลล์ differentiated N1E-115 กับน้ำคั้น PE-J, สารสกัด PE-W หรือ PE-E พร้อมกับหรือก่อนการสัมผัสกับกลูตาเมตไม่แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมต ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Rajalakshmi และคณะ^[51] ที่พบว่าสารสกัดจากผลมะขามป้อมสามารถลดการตายของเซลล์จากพิษของกลูตาเมตในเซลล์ประสาท pheochromocytoma, PC12 ผลที่แตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

การที่ผลมะขามป้อมแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ไม่แสดงผลปกป้องการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมต เป็นไปได้ว่า กลไกการเกิดพิษของกลูตาเมตมีความแตกต่างจากการเกิดพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กลูตาเมตที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทเกิดจากการกระตุ้นตัวรับกลูตาเมตมากเกินไปโดยเฉพาะ N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาท (excitotoxicity) กลไกการเกิดพิษต่อเซลล์ประสาทของกลูตาเมตนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด กลูตาเมตอาจเหนี่ยวนำให้เกิดพิษโดยทำให้แคลเซียมไหลเข้าเซลล์จำนวนมาก (calcium overload) เกิดการเสียสมดุลของแคลเซียม มีการสร้างและสะสม ROS ในปริมาณมาก เกิดการทำลายแบบออกซิเดชันนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการสูญเสียหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาทและกระตุ้นวิถีการตายของเซลล์^[60-61] สารสกัดจาก

ผลมะขามป้อมไม่สามารถปกป้องเซลล์จากพิษของกลูตาเมตได้อาจเนื่องจากกลูตาเมตทำให้เซลล์ตายโดยมีกลไกอื่นนอกเหนือจากการชักนำให้เกิด oxidative stress ร่วมอยู่ด้วย ทำให้ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดมะขามป้อมไม่เพียงพอที่จะลดการตายของเซลล์จากพิษของกลูตาเมตได้ และฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากผลมะขามป้อมน่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการกระตุ้นที่ตัวรับกลูตาเมต

MAPKs เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ ได้แก่ การแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวนเซลล์ การเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ การเคลื่อนที่ การรอดชีวิตและการตายของเซลล์ การส่งสัญญาณในวิถี MAPKs ได้แก่ MAPK และ PI3K signaling pathway ซึ่งมีความจำเป็นต่อการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์^[62] ในการศึกษานี้ได้พิสูจน์ว่าฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-W และ PE-E ในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านกระบวนการส่งสัญญาณในวิถี MAPK และวิถี PI3K หรือไม่ เมื่อให้เซลล์ประสาทสัมผัสกับสารสกัดมะขามป้อมก่อนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารสกัด PE-W และ PE-E ที่ความเข้มข้น 50 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการทดลองครั้งก่อนในการศึกษานี้ที่พบว่าสารสกัด PE-W และ PE-E ที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีฤทธิ์ปกป้องการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ การยับยั้งวิถี PI3K ด้วย PI3K inhibitor (LY294002) มีผลทำให้ลดฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-W และ PE-E ดังนั้น กลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท

ของสารสกัดจากผลมะขามป้อมในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์น่าจะออกฤทธิ์ผ่านกระบวนการส่งสัญญาณในวิถี PI3K

จากผลการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่าเป็นรายงานครั้งแรกของสารสกัดจากผลมะขามป้อมในการปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง N1E-115 เมื่อให้เซลล์ประสาทสัมผัสกับมะขามป้อมก่อนให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในแบบจำลองการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากผลมะขามป้อม และกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณในวิถี PI3K อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษานี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของผลมะขามป้อมในรูปของสารสกัดหยาบเท่านั้น หากมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเตรียมสารสกัดมะขามป้อมให้บริสุทธิ์ขึ้นเป็นสารสกัดมะขามป้อมแยกส่วน (subfraction extract) และศึกษาผลสารสกัดมะขามป้อมแยกส่วนต่อ markers ที่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress เช่น lipid peroxidation, ROS และ/หรือเอนไซม์หรือสารต้านออกซิเดชัน เช่น glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase เป็นต้น จะทำให้ทราบถึงสารสำคัญที่เป็นตัวออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมะขามป้อมที่ชัดเจนขึ้น

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ได้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของผลมะขามป้อม

ต่อความเป็นพิษจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกลูตาเมต พบว่าผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีมาก น้ำคั้น PE-J สารสกัด PE-W และ PE-E ของผลมะขามป้อมสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.41 ± 4.26 , 10.98 ± 1.14 และ 10.37 ± 1.30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยการดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.91 ± 0.62 , 20.02 ± 2.03 และ 18.08 ± 0.37 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เซลล์ N1E-115 สัมผัสกับสารสกัด PE-W และ PE-E ของผลมะขามป้อมที่ความเข้มข้น 50 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถป้องกันการตายของเซลล์จากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ นอกจากนี้ สารยับยั้งเฉพาะที่วิถี PI3K มีผลต่อการแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัด PE-W และ PE-E แสดงให้เห็นว่าสารสกัด PE-W และ PE-E ของผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ปกป้องการตายของเซลล์ประสาทจากพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยกลไกการออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทอย่างน้อยมีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชันและกระบวนการส่งสัญญาณในวิถี PI3K ดังนั้น สารสกัดจากผลมะขามป้อมอาจมีศักยภาพในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ควรมีการศึกษาต่อไปในแบบจำลองความเสื่อมของเซลล์ประสาทอื่นและในสัตว์ทดลองเพื่อตรวจสอบฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องให้ชัดเจนก่อนนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพสำหรับป้องกันหรือบรรเทาโรคที่

เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการพิษเภสัชศาสตร์ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ภาพสมุนไพรมะขามป้อม

References

1. Rudrapal M, Khairnar SJ, Khan J, Dukhyil AB, Ansari MA, Alomary MN, Alshabrimi FM, Palai S, Deb PK, Devi R. Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism(s) of action. *Front Pharmacol*. 2022;13:806470. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>.
2. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, Filip M. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol*. 2016;53:4094-125.
3. Feng J, Zheng Y, Guo M, Ares I, Martínez M, Lopez-Torres B, Martínez-Larranaga MR, Wang X, Anadón A, Martínez MA. Oxidative stress, the blood-brain barrier and neurodegenerative diseases: The critical beneficial role of dietary antioxidants. *Acta Pharm Sin B*. 2023;13(10):3988-4024.
4. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2019;24(8):1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>.
5. Chantharanonthai P. *Phyllanthus*. In: Van Welzen PC, Chayamarit K, editors. *Flora of Thailand*. Volume 8, Part 2 Euphorbiaceae (Genera G-Z). Bangkok: The Forest Herbarium, Royal Forest Department; 2007. p.473-507.
6. Gupta BM, Dhawan SM, Gupta R. *Phyllanthus emblica* (medicinal plant) research: A scientometric assessment of global publication output during 2008-17. *EC Pharmacol Toxicol*. 2019;6(1):18-28.

7. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University. Ma-Kham-Pom. [internet]. [cited 2023 Aug 7]. Available from: <https://apps.phar.ubu.ac.th/thaicrud-edrug/main.php?action=viewpage&pid=101> (in Thai).
8. Peterson CT, Denniston K, Chopra D. Therapeutic uses of Triphala in Ayurvedic medicine. *J Altern Complement Med*. 2017;23(8):607-14.
9. National List of Essential Medicines (No. 2) B.E. 2555 (2012). Published in Government Gazette on 21 August B.E. 2555 (2012). (in Thai).
10. Patel SS, Goyal RK. *Embllica officinalis* Gaert.: A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology and ethnomedicinal uses. *Res J Med Plant*. 2012;6:6-16.
11. Hasan Md R, Islam Md N, Islam Md R. Phytochemistry, pharmacological activities and tradition uses of *Embllica officinalis*: A review. *Int Curr Pharm J*. 2016;5(2):14-21.
12. Dasaraju S, Gottumukkala KM. Current trends in the research of *Embllica officinalis* (Amla): A pharmacological perspective. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2014;24(2):150-9.
13. Al-Gbouri NM, Am H. Evaluation of *Phyllanthus emblica* extract as antibacterial and antibiofilm against biofilm formation bacteria. *Iraqi J Agric Sci*. 2018;49(1):142-51.
14. Gunti L, Dass RS, Kalagatur NK. Phytofabrication of selenium nanoparticles from *Embllica officinalis* fruit extract and exploring its biopotential applications: Antioxidant, antimicrobial, and biocompatibility. *Front Microbiol*. 2019;10:931. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00931>.
15. Renuka R, Devi KR, Sivakami M, Thilagavathi T, Uthrakumar R, Kaviyarasu K. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Phyllanthus emblica* fruit extract for antimicrobial application. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2020;24(8):101567. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101567>.
16. Prakash D, Upadhyay G, Gupta C, Pushpangadan P, Singh KK. Antioxidant and free radical scavenging activities of some promising wild edible fruits. *Int Food Res J*. 2012;19(3):1109-16.
17. Sheoran S, Nidhi P, Kumar V, Singh G, Lal UR, Sourirajan A, Dev K. Altitudinal variation in gallic acid content in fruits of *Phyllanthus emblica* L. and its correlation with antioxidant and antimicrobial activity. *Vegetos*. 2019;32(3):387-96.
18. Li W, Zhang X, Chen R, Li Y, Miao J, Liu G, Lan Y, Chen Y, Cao Y. HPLC fingerprint analysis of *Phyllanthus emblica* ethanol extract and their antioxidant and anti-inflammatory properties. *J Ethnopharmacol*. 2020;254:112740. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112740>
19. Wang HMD, Fu L, Cheng CC, Gao R, Lin MY, Su HL, Belinda NE, Nguyen TH, Lin W, Lee PC, Hsieh LP. Inhibition of LPS-Induced oxidative damages and potential anti-inflammatory effects of *Phyllanthus emblica* extract via down-regulating NF- κ B, COX-2, and iNOS in RAW 264.7 cells. *Antioxidants*. 2019;8(8):270. <http://doi.org/10.3390/antiox8080270>.
20. Li W, Zhu HW, Chen YJ, Xiao H, Ge YZ, Hu HE, Li XL, Cao Y. Bioactivity-guided isolation of anti-inflammatory components from *Phyllanthus emblica*. *Food Sci Nutri*. 2020b;8(6):2670-9.
21. Perianayagam JB, Sharma SK, Joseph A, Christina AJM. 2004. Evaluation of antipyretic and analgesic activity of *Embllica officinalis* Gaertn. *J Ethnopharmacol*. 2004;95(1):83-5.
22. Mythilypriya R, Shanthi P, Sachdanandam P. Analgesic, antipyretic and ulcerogenic properties of an indigenous formulation-Kalpaamruthaa. *Phytother Res*. 2007;21(6):574-8.
23. Nosál'ová G, Mokry J, Hassan KM. Antitussive activity of the fruit extract of *Embllica officinalis* Gaertn. (*Euphorbiaceae*). *Phytomedicine*. 2003;10(6-7):583-9.
24. Zhao T, Sun Q, Marques M, Witcher M. Anticancer properties of *Phyllanthus emblica* (IndianGooseberry). *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:950890. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/950890>.
25. Kumnerdkhonkaen P, Saenglee S, Asgar MA, Senawong G, Khongsukwiwat K, Senawong T. Antiproliferative activities and phenolic acid content of water and ethanolic extracts of the powdered formula of *Houttuynia cordata* Thunb. fermented broth and *Phyllanthus emblica* Linn. fruit. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1): <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2185-x>.
26. Fatima N, Hafizur RM, Hameed A, Ahmed S, Nisar M, Kabir N. Ellagic acid in *Embllica officinalis* exerts anti-diabetic activity through the action on β -cells of pancreas. *Eur J Nutri*. 2017;56(2):591-601.
27. Srinivasan P, Vijayakumar S, Kothandaraman S, Palani M. Anti-diabetic activity of quercetin extracted from *Phyllanthus emblica* L. fruit: In silico and in vivo approaches. *J Pharm Anal*. 2018;8(2):109-18.
28. Sharma P, Joshi T, Joshi T, Chandra S, Tamta S. In silico screening of potential antidiabetic phytochemicals from *Phyllanthus emblica* against therapeutic targets of type 2 diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2020;248:112268. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112268>

- doi.org/10.1016/j.jep.2019.112268.
29. Variya BC, Bakrania AK, Patel SS. Antidiabetic potential of gallic acid from *Emblica officinalis*: improved glucose transporters and insulin sensitivity through PPAR- γ and Akt signaling. *Phytomedicine*. 2020;73:152906. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152906>.
 30. Kim HJ, Yokozawa T, Kim HY, Tohda C, Rao TP, Juneja LR. Influence of amla (*Emblica officinalis* Gaertn.) on hypercholesterolemia and lipid peroxidation in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2005;51(6):413-8.
 31. Santoshkumar J, Manjunath S, Sakhare Pranavkumar M. A study of anti-hyperlipidemia, hypolipidemic and anti-atherogenic activity of fruit of *Emblica officinalis* (Amla) in high fat fed albino rats. *Int J Med Res Health Sci*. 2013;2(1):70-7.
 32. Khanna S, Das A, Spieldenner J, Rink C, Roy S. Supplementation of a standardized extract from *Phyllanthus emblica* improves cardiovascular risk factors and platelet aggregation in overweight/class-1 obese adults. *J Med Food*. 2015;18(4):415-20.
 33. Chatterjee A, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay SK. Biphasic effect of *Phyllanthus emblica* L. extract on NSAID-induced ulcer: An antioxidative trail weaved with immunomodulatory effect. *Evid-Based Complement Altern Med*. 2010;2011:146808. <https://doi.org/10.1155/2011/146808>.
 34. Malik S, Suchal K, Bhatia J, Khan SI, Vasisth S, Tomar A, Goyal S, Kumar R, Arya DS, Ojha SK. Therapeutic potential and molecular mechanisms of *Emblica officinalis* Gaertn in countering nephrotoxicity in rats induced by the chemotherapeutic agent Cisplatin. *Front Pharmacol*. 2016;7:350. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00350>.
 35. Huang CZ, Tung YT, Hsia SM, Wu CH, Yen GC. The hepatoprotective effect of *Phyllanthus emblica* L. fruit on high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in SD rats. *Food Funct*. 2017;8(2):842-50.
 36. Tung YT, Huang CZ, Lin JH, Yen GC. Effect of *Phyllanthus emblica* L. fruit on methionine and choline-deficiency diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *J Food Drug Anal*. 2018;26(4):1245-52.
 37. Yin K, Li X, Luo X, Yuru Sha Y, Gong P, Gu J, Rui Tan R. Hepatoprotective effect and potential mechanism of aqueous extract from *Phyllanthus emblica* on carbon-tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Evid Based Complement Altern Med*. 2021;2021:5345821. <https://doi.org/10.1155/2021/5345821>.
 38. Deep G, Dhiman M, Rao AR, Kale RK. Chemopreventive potential of Triphala (a composite Indian drug) on benzo (a) pyrene induced forestomach tumorigenesis in murine tumor model system. *J Exp Clin Cancer Res*. 2005;24(4):555-63.
 39. Krishnaveni M, Mirunalini S. Chemopreventive of *Phyllanthus emblica* L.(amla) fruit extract on 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene induced oral carcinogenesis-a dose-response study. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012;34(3):801-10.
 40. Adil MD, Kaiser P, Satti NK, Zargar AM, Vishwakarma RA, Tasduq SA. Effect of *Emblica officinalis* (fruit) against UVB-induced photo-aging in human skin fibroblasts. *J Ethnopharmacol*. 2010;132(1):109-14.
 41. Singh MK, Yadav SS, Gupta V, Khattri S. Immunomodulatory role of *Emblica officinalis* in arsenic induced oxidative damage and apoptosis in thymocytes of mice. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13:193. <https://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/193>.
 42. Zeng Z, Lv W, Jing Y, Chen Z, Song L, Liu T, Yu R. Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from *Phyllanthus emblica*. *Drug Discov Ther*. 2017;11(2):54-63.
 43. Mathew M, Subramanian S. *In vitro* screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. *PloS One*. 2014;9(1):e86804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086804>.
 44. Uddin MS, Al Mamun A, Hossain MS, Akter F, Iqbal MA, Asaduzzaman M. Exploring the effect of *Phyllanthus emblica* L. on cognitive performance, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity in rats: Promising natural gift for the mitigation of Alzheimer's disease. *Ann Neurosci*. 2016;23(4):218-29.
 45. Thenmozhi AJ, Dhivyabharathi M, William Raja TR, Manivasagam T, Essa MM. Tannoid principles of *Emblica officinalis* renovate cognitive deficits and attenuate amyloid pathologies against aluminum chloride induced rat model of Alzheimer's disease. *Nutr Neurosci*. 2016a;19(6):269-78.
 46. Thenmozhi AJ, Dhivyabharathi M, Manivasagam T, Essa MM. Tannoid principles of *Emblica officinalis* attenuated aluminum chloride induced apoptosis by suppressing oxidative stress and tau pathology via Akt/GSK-3 β signaling pathway. *J Ethnopharmacol*. 2016b;194:20-9.
 47. Bharathi MD, Thenmozhi AJ. Attenuation of aluminum-

- induced neurotoxicity by tannoid principles of *Emblica officinalis* in Wistar rats. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis*. 2018;8(2):35-40.
48. Husain I, Akhtar M, Madaan T, Vohora D, Abdin MZ, Islamuddin M, Najmi AK. Tannins enriched fraction of *Emblica officinalis* fruits alleviates high-salt and cholesterol diet-induced cognitive impairment in rats via Nrf2-ARE pathway. *Front Pharmacol*. 2018;9:23. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00023>.
49. Husain I, Akhtar M, Shaharyar M, Islamuddin M, Abdin MZ, Akhtar MJ, Najmi AK. High-salt-and cholesterol diet-associated cognitive impairment attenuated by tannins-enriched fraction of *Emblica officinalis* via inhibiting NF-kB pathway. *Inflammopharmacol*. 2018;26(1):147-56.
50. Sukma M, Ngawhirunpat T, Sripattanaporn A. Neuro-protective and anti-inflammatory effects of three fruits of Triphala, *Emblica officinalis*, *Terminalia chebula* and *T. bellerica*. *Proceedings Silpakorn University International Conference on Academic Research and Creative Arts: Integration of Art and Science*; 2012 Jan 25-27; Nakhon Pathom, Thailand. Nakhon Pathom; 2012. p. PE-65-74.
51. Rajalakshmi S, Vijayakumar S, Praseetha PK. Neuroprotective behaviour of *Phyllanthus emblica* (L) on human neural cell lineage (PC12) against glutamate-induced cytotoxicity. *Gene Rep*. 2019;17:100545. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100545>.
52. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia. Vol.II 2021. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2021. 2007p.
53. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: A simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*. 1987;165(1):215-9.
54. Nishikimi M, Appaji N, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;46(2):849-54.
55. Amano T, Richelson E, Nirenberg M. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972;69:258-63.
56. Kimhi Y, Parfrey C, Spector I, Barak Y, Littauer UZ. Maturation of neuroblastoma cells in the presence of dimethylsulfoxide. *Biochemistry*. 1976;73:462-6.
57. Siddiqui MA, Kashyap MP, Kumar V, Tripathi VK, Khanna VK, Yadav S, Pant AB. Differential protection of pre-, co- and post-treatment of curcumin against hydrogen peroxide in PC12 cells. *Hum Exp Toxicol*. 2010;30(3):192-8.
58. Afshari AR, Fanoudi S, Rajabian A, Sadeghnia HR, Mollazadeh H, Hosseini A. Potential protective roles of phytochemicals on glutamate induced neurotoxicity: A review. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23:1113-23.
59. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
60. Prentice H, Modi JP, Wu JY. Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:964518. <https://doi.org/10.1155/2015/964518>.
61. Jakaria M, Park SY, Haque E, Karthivashan G, Kim IS, Ganesan P, Choi DK. Neurotoxic agent-induced injury in neurodegenerative disease model: Focus on involvement of glutamate receptors. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:307. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00307>.
62. Dinsmore CJ, Soriano P. MAPK and PI3K signaling: At the crossroads of neural crest development. *Dev Biol*. 2018;444(Suppl1):S79-97. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.02.003>.