



รายงานการวิจัย

เรื่อง

ประสิทธิภาพของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน
ต่อการต้านการอักเสบและความยืดหยุ่นของสมองในหนูไมซ์ที่มี
ภาวะการอักเสบของระบบประสาทและพฤติกรรมผิดปกติ

**The efficacy of andrographolide encapsulated in liposome nanoemulsion
on anti-inflammatory and brain plasticity in mice with
neuroinflammation and behavioral abnormality**

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศราวุธ งามณีชัย

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสยาม

(ด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประเภททุนสนับสนุนงานพื้นฐาน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2567)

ประสิทธิภาพของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมัลชันต่อ
การต้านการอักเสบและความยืดหยุ่นของสมองในหนูไมซ์ที่มี
ภาวะการอักเสบของระบบประสาทและพฤติกรรมผิดปกติ

**The efficacy of andrographolide encapsulated in liposome nanoemulsion on
anti-inflammatory and brain plasticity in mice with
neuroinflammation and behavioral abnormality**

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศราวุธ ตากมณีย์
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสยาม

(ด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประเภททุนสนับสนุนงานพื้นฐาน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2567)

ชื่อโครงการ ประสิทธิภาพของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันต่อการต้านการอักเสบและความยืดหยุ่นของสมองในหนูไม่ช้ำที่มีภาวะการอักเสบของระบบประสาทและพฤติกรรมผิดปกติ

ผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม
2. ดร. ศักรินทร์ ภูพานิต คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม
3. ดร.มัตถกา คงขาว ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ
4. ดร.กทาวุธ นามดี ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ

บทคัดย่อ

การอักเสบเรื้อรังทำให้เกิดอาการป่วยทางจิต และการใช้ยาต้านการอักเสบอย่างต่อเนื่องอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบขนส่งสารต้านการอักเสบแอนโดรกราโฟไลด์ (Andro) ด้วยการห่อหุ้มในลิโปโซมนาโนอิมันชัน (NLCs) ในการเพิ่มประสิทธิภาพทางเภสัชวิทยาและรักษาการอักเสบ ผลการสังเคราะห์สาร AndroNLCs พบว่า มีความเป็นเนื้อเดียวกันด้วย ขนาดอนุภาค 131.40 ± 1.30 นาโนเมตร และประสิทธิภาพการห่อหุ้ม 89% อีกทั้งสาร AndroNLCs มีความเสถียรในระบบทางเดินอาหารจำลองดีขึ้น ซึ่งสามารถนำสารเข้าสู่เซลล์ มีความเป็นพิษต่ำและลดปริมาณสารอักเสบ IL-6 และ TNF-อัลฟา ในเซลล์เพาะเลี้ยงนิวโรบลาสโตมา SH-SY5Y ยิ่งไปกว่านั้น การป้อนสาร AndroNLCs ขนาด 10 มก./กก. (ทุกวันเป็นเวลา 14 วัน) สามารถฟื้นฟูการลดลงของน้ำหนักร่างกาย บรรเทาพฤติกรรมวิตกกังวลและซึมเศร้า การลดลงของความหนาของชั้นเนื้อเยื่อและความอยู่รอดของเซลล์ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูเม้าเพศผู้สายพันธุ์ C57BL/6 ที่ถูกชักนำด้วยการอักเสบด้วยการฉีด TNF-อัลฟาในช่องท้องขนาด 63 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ซึ่งผ่านการปรับการทำงานของยีนและโปรตีน BDNF ที่ควบคุมความยืดหยุ่นของซินแนปส์ ทั้งนี้สาร AndroNLCs มีประสิทธิภาพเทียบเคียงยาลดการอักเสบและยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน คือ ยาเด็ทซาเมทาโซนและเวนลาฟาซีน ผลการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสาร AndroNLCs ชะลอสภาวะการอักเสบของระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางอารมณ์ ดังนั้นสาร AndroNLCs สูตรนี้สามารถนำไปศึกษาต่อยอดในระดับชั้นคลินิกเพื่อนำไปรักษาความผิดปกติทางจิตเวชที่เกิดจากการอักเสบเชิงระบบ

คำสำคัญ แอนโดรกราโฟไลด์, การอักเสบ, ตัวพาไขมันนาโน, ประสาทอักเสบ, พฤติกรรมเครียด

Research title THE EFFICACY OF ANDROGRAPHOLIDE ENCAPSULATED IN LIPOSOME NANOEMULSION ON ANTI-INFLAMMATORY AND BRAIN PLASTICITY IN MICE WITH NEUROINFLAMMATION AND BEHAVIORAL ABNORMALITY

Researchers

1. Assist. Prof. Dr. Sarawut Lapmanee, Faculty of Medicine, Siam University
2. Dr. Sakkarin Bhubhanil, Faculty of Medicine, Siam University
3. Dr. Mattaka Kongkow, National Nanotechnology Centre
4. Dr. Katawut Namdee, National Nanotechnology Centre

ABSTRACT

Chronic inflammation contributes to the development of mental illness, while prolonged use of conventional anti-inflammatory drugs may lead to adverse side effects. This study aimed to develop a drug delivery system for andrographolide (Andro) using liposome nanoemulsion (NLCs) in order to enhance the pharmacological efficacy of the anti-inflammatory treatment. The resulting AndroNLCs synthesis was homogeneous, with a particle size of 131.40 ± 1.30 nm and an encapsulation efficiency of 89%. Additionally, AndroNLCs exhibited superior stability in a simulated gastrointestinal environment, demonstrated efficient cellular internalization, showed low cytotoxicity, and significantly reduced the levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF-alpha in SH-SY5Y neuroblastoma cell cultures. Furthermore, the oral administration of AndroNLCs at a dosage of 10 mg/kg (daily for 14 days) restored inflammation-induced reductions in body weight, alleviated anxiety- and depression-like behaviors, and improved neuronal layer thickness and cell survival in the hippocampus of male C57BL/6 mice subjected to intraperitoneal TNF-alpha injection, through the modulation of BDNF, which regulates synaptic plasticity. In addition, AndroNLCs demonstrated comparable efficacy to that of the standard anti-inflammatory agent dexamethasone and the antidepressant venlafaxine. These results show the potential of AndroNLCs for alleviating neuroinflammatory status contributing to mood disorders. Therefore, this AndroNLC formulation could be further investigated in clinical settings for psychiatric illnesses resulting from systemic inflammation.

Keywords: andrographolide, inflammation, nano-lipid carrier, neuroinflammation, stress behaviors

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงตามแผนงานวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะวิจัย ดร.มัตถกา คงขาว และ ดร.ศทาวุธ นามดี นักวิจัยอาวุโส ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ดร.ทนพ.ณัฐวุฒิ เจริญผล คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ดร.อัญจรีย์ อินจันทร์ คณะแพทยศาสตร์ สถาบันพระบรมราชชนก และ รศ. ดร.ประพิมพรรณ วงศ์จิตรตันน์ ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรม และชีวการแพทย์สารสนเทศ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการพัฒนาการห่อหุ้มสารนาโนและวิเคราะห์ข้อมูลเนื้อเยื่อระดับจุลภาคด้วยเครื่องมือวิจัยขั้นสูง รวมทั้งให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอนุกรรมการจรรยาบรรณการวิจัยในสัตว์และคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ในการอนุมัติให้โครงการวิจัยสามารถดำเนินงานวิจัยในสัตว์ทดลอง รวมถึงนายสัตวแพทย์วีรยุทธ ยี่มีมา รองผู้อำนวยการ นางสาวสิริวรรณ ศรีวงศ์ นักวิทยาศาสตร์ และ นางสาวสุกัญญา คุณแก้วอ้อม นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และ ดร.ณัฐพล สุขกมลเสนีย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ที่ช่วยเหลือด้านสัตว์ทดลอง

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยมูลฐาน (Fundamental Fund) ประเภท Basic Research Fund กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กสว.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 และสำนักส่งเสริมและพัฒนางานวิจัย มหาวิทยาลัยสยาม ในการสนับสนุนทุนการวิจัยและส่งเสริมการดำเนินงานวิจัยให้ประสบความสำเร็จ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
หลักการและเหตุผล	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	4
กรอบแนวคิดการวิจัย	4
สมมติฐานการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย	5
นิยามศัพท์เฉพาะ	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
การอักเสบของระบบประสาทและโรคจิตเวช	7
ประสิทธิภาพยาต้านการดูดกลับเซโรโทนินและนอร์อีพิเนเฟริน	9
สรรพคุณของสารแอนโดรกราโฟไลด์และระบบขนส่งลิโปโซมนาโนอิมันชั้น	10
ความสามารถในการยึดหยุ่นของเซลล์ประสาทและพฤติกรรมประสาท	13
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	
การสังเคราะห์ลิโปโซมนาโนอิมันชั้นที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์	15
ประสิทธิภาพการห่อหุ้มและความสามารถในการบรรจุ	15
การประเมินขนาด รูปร่าง และสารแอนโดรกราโฟไลด์	16
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง	16
การเข้าสู่เซลล์ของลิโปโซมนาโนอิมันชั้นที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์	17
สัตว์ทดลอง	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การเห็นขวนำให้ระบบประสาทอักเสบ.....	19
การบริหารสารต้านการอักเสบ.....	19
การทดสอบพฤติกรรม.....	19
การสลับและเก็บอวัยวะตัวอย่าง.....	20
การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและสารอักเสบ.....	20
ปริมาณโปรตีนส่งเสริมการสร้างเซลล์ประสาทในสมอง.....	21
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	22
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
ลักษณะสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน.....	23
ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์.....	24
ปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชัน.....	24
ผลความปลอดภัยของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชัน.....	25
ผลการเข้าสู่เซลล์ของลิโปโซมนาโนอิมันชันที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์.....	26
พฤติกรรมวิตกกังวลและการเคลื่อนไหวร่างกาย.....	28
พฤติกรรมซึมเศร้าสิ้นหวังและความจำในการแยกแยะวัตถุ.....	29
ผลสารชีวเคมีบ่งชี้ความเครียดและการอักเสบในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส.....	30
ผลปริมาณยีนและโปรตีนบ่งชี้ความยืดหยุ่นของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส.....	31
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
สรุปผลการวิจัย.....	32
อภิปรายผล.....	32
ข้อเสนอแนะ.....	37
บรรณานุกรม.....	38
ภาคผนวก	
ก หนังสืออนุวัติการพิจารณาจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง.....	50
ข นิพนธ์ต้นฉบับบทความวิจัย.....	52
ค การเข้าร่วมนำเสนอผลงานวิจัย.....	53
ประวัติผู้วิจัย.....	54

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 รายการไพเมอร์ในการศึกษาปริมาณฮินในสมองหนูเม้าส์.....	21
ตารางที่ 3.2 รายการแอนติบอดีในการศึกษาปริมาณโปรตีนในสมองหนูเม้าส์.....	22
ตารางที่ 4.1 ขนาดและค่าการกระจายตัวของอนุภาคนาโนนำส่งสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร....	24



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1.1 แผนผังตัวแปรต้นและตัวแปรตามของงานวิจัย.....	4
ภาพที่ 2.1 สรีรพยาธิวิทยาการอักเสบของระบบประสาท.....	8
ภาพที่ 2.2 กลไกยาเวนลาฟาซีน.....	10
ภาพที่ 2.3 ลักษณะพฤกษศาสตร์ของฟ้าทะลายโจรและโครงสร้างเคมีแอนโดรกราโฟไลด์.....	11
ภาพที่ 2.4 การสังเคราะห์และการขนส่งสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซม.....	12
ภาพที่ 2.5 ขบวนการสร้างความจำในสมอง.....	14
ภาพที่ 3.1 แผนดำเนินงานวิจัยในสัตว์ทดลอง.....	18
ภาพที่ 4.1 โครงสร้างอนุภาคนาโนที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์และผลิตภัณฑ์.....	23
ภาพที่ 4.2 โครมาโทแกรมของสารแอนโดรกราโฟไลด์.....	25
ภาพที่ 4.3 ความเป็นพิษของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชัน.....	26
ภาพที่ 4.4 การเข้าสู่เซลล์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชัน.....	27
ภาพที่ 4.5 ผลของสารลดการอักเสบต่อพฤติกรรมวิตกกังวลและการเคลื่อนไหวร่างกาย.....	28
ภาพที่ 4.6 ผลของสารลดการอักเสบต่อพฤติกรรมซึมเศร้า.....	29
ภาพที่ 4.7 ผลของสารลดการอักเสบต่อการจดจำวัตถุใหม่.....	29
ภาพที่ 4.8 ผลของสารลดการอักเสบต่อฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและสารชักนำการอักเสบ.....	30
ภาพที่ 4.9 ผลของสารลดการอักเสบการแสดงออกของปริมาณฮีน/โปรตีนความยืดหยุ่นสมอง.....	31

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

เนื่องด้วยการเปลี่ยนแปลงรูปแบบวิถีการดำเนินชีวิตจากสถานการณ์ปัญหาอบด้าน ได้แก่ เศรษฐกิจและสังคม การแพร่ระบาดของโรคติดเชื้อ ภัยธรรมชาติ และสงคราม ก่อให้เกิดความเครียดและส่งผลต่อสุขภาพกายและสุขภาพจิต ในปี ค.ศ. 2019 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ได้รายงานอุบัติการณ์ของโรคจิตเวช จำนวน 970 ล้านคนทั่วโลก ยิ่งไปกว่านั้น กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข ได้รายงานจำนวนผู้ป่วยนอกปี 2564 มีจำนวน 1,080,303 คน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในปี 2565 (กรมสุขภาพจิต, 2565) โรคจิตเวชมีความผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิกในการรับรู้ การควบคุมอารมณ์ หรือพฤติกรรมของแต่ละบุคคล มักเกี่ยวข้องกับความสุขหรือการด้อยค่าในชีวิต องค์การอนามัยโลกประกาศบัญชีจำแนกโรคระหว่างประเทศฉบับที่ 11 นิยามความผิดปกติทางจิตหรือภาวะสุขภาพจิตผิดปกติ คือ ความพิการทางจิตสังคม และสภาพจิตใจที่เกี่ยวข้องกับความสุขและส่งผลต่อในการทำงาน หรือความเสี่ยงต่อการทำร้ายตนเอง (International Classification of Diseases 11th Revision, ICD-11) โดยอาการวิตกกังวลและโรคซึมเศร้ามักพบบ่อยที่สุด ถัดมาในปี ค.ศ. 2020 จำนวนผู้ป่วยโรควิตกกังวลและโรคซึมเศร้าเพิ่มขึ้นอย่างมากสถานการณ์โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 มากกว่าร้อยละ 26% และ 28% ตามลำดับ (WHO, 2022)

ทั้งนี้ปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคจิตเวช ประกอบด้วย ปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ พันธุกรรม ประวัติสมาชิกในครอบครัวเป็นโรคจิตเวช รวมถึงการมีฮอร์โมนหรือสารเคมีในสมองที่ไม่สมดุล ปัจจัยทางจิตวิทยาหรือมีลักษณะนิสัยเป็นคนอ่อนไหวง่าย คิดมาก มองโลกในแง่ลบ ปัจจัยสภาพแวดล้อม สังคม และวัฒนธรรม ได้แก่ การเลี้ยงดูของพ่อแม่ อิทธิพลจากคนใกล้ชิดรอบข้าง เป็นต้น (Park and Kim, 2019; Tripathi et al., 2019) นอกจากนี้ความผิดปกติทางจิตอาจเกิดจากการมีปัจจัยมากระตุ้นที่ทำให้เกิดความเครียดหรืออาจเกิดขึ้นโดยไม่มีปัจจัยมากระตุ้น รวมไปถึงการติดเชื้อและการบาดเจ็บที่ทำให้ระบบประสาทอักเสบและส่งผลต่อกระบวนการทำงานของร่างกาย การแสดงออกพฤติกรรม อารมณ์และความจำบกพร่อง และนำไปสู่การเกิดโรคทางจิตเวชได้ (Bauer and Teixeira, 2021) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความผิดปกติของระดับฮอร์โมนความเครียดที่เพิ่มขึ้นสามารถผ่านเนื้อเยื่อตัวกั้นระหว่างเลือดกับสมองส่งผลให้การอักเสบของระบบประสาทในสมองเพิ่มขึ้นด้วยการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ไมเกลียและเพิ่มปริมาณสารอักเสบในสมอง

อีกทั้งรบกวนการทำงานและปริมาณสารสื่อประสาท โมนโอเอมีน การทำงานระดับเซลล์ และโมเลกุลภายในสมองและวงจรประสาท และยับยั้งความยืดหยุ่นและการสร้างเซลล์ประสาทให้สมอง ได้แก่ โปรตีนส่งเสริมการสร้างเซลล์สมองบีดีเอ็นเอฟ (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) และจีดีเอ็นเอฟ (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) ทำให้ผู้ป่วยทางจิตเวชมีอาการแปรปรวนและเสี่ยงต่อภาวะความจำบกพร่องได้ (Slavich and Irwin, 2014; Lucassen et al., 2015; Liu et al., 2018; Gu et al., 2020)

ดังนั้นยาที่ปรับยาปรับการทำงานของสารสื่อประสาท โมนโอเอมีน ได้แก่ เซโรโทนิน นอร์อิพิเนเฟริน และโดปามีนจึงถูกนำมาใช้รักษาผู้ป่วยจิตเวชเพื่อบรรเทาอาการเครียดและเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาทให้เพียงพอต่อการทำงานของวงจรประสาท (Morgese and Trabace, 2019) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาเวนลาฟาซีน (venlafaxine) สามารถออกฤทธิ์ต้านการดูดกลับเซโรโทนินและนอร์อิพิเนเฟริน และมีประสิทธิภาพในการบรรเทาอาการวิตกกังวลแบบทั่วไปและอาการซึมเศร้า (Li et al., 2017) รวมทั้งผลการศึกษาของคณะวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ยาเวนลาฟาซีน สามารถลดพฤติกรรมกังวล ซึมเศร้าและความจำบกพร่องด้วยการลดระดับฮอร์โมนความเครียดและเพิ่มปริมาณโปรตีนส่งเสริมการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ในสมองบีดีเอ็นเอฟในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียด (Lapmanee et al., 2012; 2013; 2017) ยิ่งไปกว่านั้นยาในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) หรือยับยั้งกระบวนการอักเสบและลดการสร้างสารอักเสบไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-วันเบต้า (IL-1beta), ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF-alpha) และเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส-2 (cyclooxygenase 2, COX2) (Hajhashemi et al., 2015; Mahnashi et al., 2022) อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยบางรายอาจไม่ตอบสนองต่อยาลดการอักเสบดังกล่าวและได้มีอาการข้างเคียงจากการรักษาเป็นระยะเวลานาน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาเดกซามาทาโซน (Dexamethasone) ซึ่งเป็นยากลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ (Glucocorticoid) ที่ช่วยลดการหลั่งสารชักนำการอักเสบแต่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่ออวัยวะทางเดินอาหาร ปัญหาการนอนหลับ และความดันโลหิตสูง เป็นต้น (Noreen et al., 2021; Johnson et al., 2023) ฉะนั้นการพัฒนาสมุนไพรที่มีความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการบรรเทาอาการอักเสบเชิงระบบและชะลอการดำเนินโรคจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการรักษาผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงและผู้ป่วยโรคทางจิตเวช

ปัจจุบันภาครัฐสนับสนุนให้มีการใช้สมุนไพรจากการพัฒนาด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่นและการแพทย์แผนไทยเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลักดันยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรที่มีสารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) เข้าสู่บัญชียาหลักแห่งชาติให้เทียบเคียงกับรายการกับยาแผนปัจจุบันในการรักษาไข้หวัดและการอักเสบระบบทางเดินหายใจ

สารแอนโดรกราโฟไลด์จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) เป็นสารในกลุ่มไดเทอร์ปีน แลคโตน (Terpene Lactone) มีฤทธิ์ลดไข้ ด้านการอักเสบ เชื้อแบคทีเรียและไวรัส ซึ่งสารแอนโดรกราโฟไลด์มีความสามารถละลายน้ำได้น้อย จึงอาจส่งผลให้จำกัดประสิทธิภาพทางเภสัชวิทยา (Hu et al., 2017; Mussard et al., 2019; Yen et al., 2020)

ฉะนั้นการพัฒนาสารแอนโดรกราโฟไลด์ด้วยนวัตกรรมทางชีวการแพทย์ที่สามารถขนส่งสารไปยังอวัยวะอย่างตรงเป้าหมาย รวมถึงการคงสภาพคุณสมบัติเคมีในสารละลายภายในอวัยวะทางเดินอาหารและพร้อมในดูดซึมจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาศาสตร์และประสิทธิภาพในการลดการอักเสบของสารแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งอาจนำมาวิธีการหนึ่งในการลดภาวะอักเสบของระบบประสาทและอาการพฤติกรรมที่ผิดปกติได้ ยิ่งไปกว่านั้น โครงการวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือจาก ดร. กทาวุธ นามดี และ ดร. มัตถกา คงขาว นักวิจัยศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ในการพัฒนาและสังเคราะห์ระบบส่งยาหรือสารชีวภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมของสารสมุนไพร จึงสามารถนำองค์ความรู้เทคโนโลยีระบบขนส่งสารแอนโดรกราโฟไลด์ด้วยการห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชันที่สามารถนำพาสารด้วยอนุภาคไขมันนาโนให้กระจายภายในเนื้อเยื่อเป้าหมายและปรับปรุงการดูดซึมให้ดีขึ้น (Casamonti et al., 2019) โดยขั้นตอนการสังเคราะห์มีความจำเพาะในการเพิ่มฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารแอนโดรกราโฟไลด์

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานผลการศึกษาเปรียบเทียบของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันและยาต้านการดูดกลับเซโรโทนินและนอร์อิพิเนฟรินต่อการลดภาวะการอักเสบของระบบประสาทและบรรเทาอาการการแสดงออกของพฤติกรรมที่ผิดปกติ รวมกลไกการเปลี่ยนแปลงของความยืดหยุ่นในสมองส่วนที่ควบคุมพฤติกรรมอารมณ์ และความจำ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงทำการศึกษาในสัตว์ทดลองแบบจำลองภาวะอักเสบของระบบประสาทซึ่งสร้างองค์ความรู้ใหม่ด้านสรีรวิทยา ประสาทวิทยาศาสตร์ และเภสัชศาสตร์ ในการพัฒนาระบบขนส่งยาและระบุเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์เพื่อบรรเทาอาการภาวะอักเสบและความผิดปกติทางจิตเวช

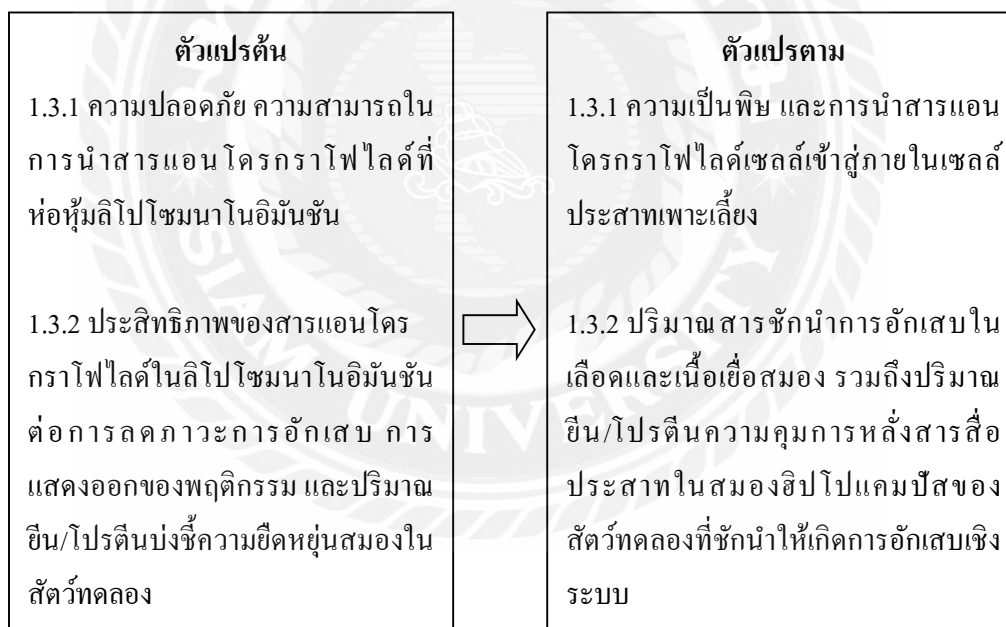
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาระบบขนส่งสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันต่อการลดการอักเสบของระบบประสาทและประสาทพฤติกรรม ได้แก่ วิตกกังวล ซึมเศร้า และความจำบกพร่องในสัตว์ทดลอง

1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณยีนและโปรตีนบ่งชี้ความยืดหยุ่นของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

1.3 กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1.1 แผนผังตัวแปรต้นและตัวแปรตามของงานวิจัย

1.4 สมมติฐานการวิจัย

สารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันมีความปลอดภัยและนำสารสำคัญเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง อีกทั้งลดภาวะอักเสบในสัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดการอักเสบเชิงระบบ ด้วยการลดสารอักเสบ และฟื้นฟูปริมาณอิน/โปรตีนควบคุมความยืดหยุ่นในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันต่อการต้านการอักเสบและความผิดปกติของพฤติกรรมในแบบจำลองที่เกิดการอักเสบของระบบประสาทจากความเครียด โดยมีขั้นตอนการศึกษาหลัก คือ การพัฒนาระบบขนส่งสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันที่มีความปลอดภัยและสามารถดูดซึมได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยง จากนั้นทำการประเมินฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของระบบนี้ต่อแบบจำลองการอักเสบของระบบประสาทและพฤติกรรมที่ผิดปกติในสัตว์ทดลอง รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของอิน/โปรตีนบ่งชี้ความยืดหยุ่นของสมอง ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปเผยแพร่ในวารสารที่อยู่ในฐานข้อมูล Scopus อย่างน้อย 1 เรื่อง โดยคาดหวังว่า ผลการวิจัยนี้จะนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคทางสมอง เช่น โรคอัลไซเมอร์ และความผิดปกติทางจิตในอนาคต

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.6.1 สารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide) เป็นสารประกอบหลักที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระ ด้านเชื้อจุลชีพ และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

1.6.2 พฤติกรรม (behavior) คือ การกระทำ การตอบสนอง หรือการแสดงออกของสิ่งมีชีวิตต่อสิ่งเร้า ซึ่งสามารถเกิดขึ้นจากปัจจัยทางชีวภาพ หรือจากปัจจัยทางจิตใจและสิ่งแวดล้อม

1.6.3 ระบบขนส่งยา (Drug delivery system) คือ เทคโนโลยีหรือวิธีการที่ใช้ในการนำยาหรือสารออกฤทธิ์เข้าสู่ร่างกายเพื่อให้ยาหรือสารนั้นถูกปลดปล่อยในตำแหน่งเป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย

16.4 การอักเสบ (inflammation) คือ กระบวนการตอบสนองของร่างกายต่อการบาดเจ็บ, การติดเชื้อ, หรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เช่น แบคทีเรีย, ไวรัส, สารเคมี หรือการบาดเจ็บทางกาย กระบวนการนี้เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่พยายามป้องกันและรักษาอันตรายที่เกิดขึ้น

16.5 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological effect) คือ ผลที่เกิดขึ้นจากการที่ยาหรือสารเคมีออกฤทธิ์ต่อร่างกายหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยเกี่ยวข้องกับวิธีการที่ยาหรือสารออกฤทธิ์ และมีผลกระทบต่อกระบวนการทางชีวภาพ

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 สร้างองค์ความรู้การด้านการขนส่งระบบยาและความปลอดภัยทางชีวภาพของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน

1.7.2 ทราบถึงวิธีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันเพื่อเป็นยาทางเลือกในการรักษาภาวะอักเสบของระบบประสาท ซึ่งสามารถนำมารักษาผู้ที่มีความเสี่ยงและผู้ป่วยจิตเวชได้

บทที่ 2

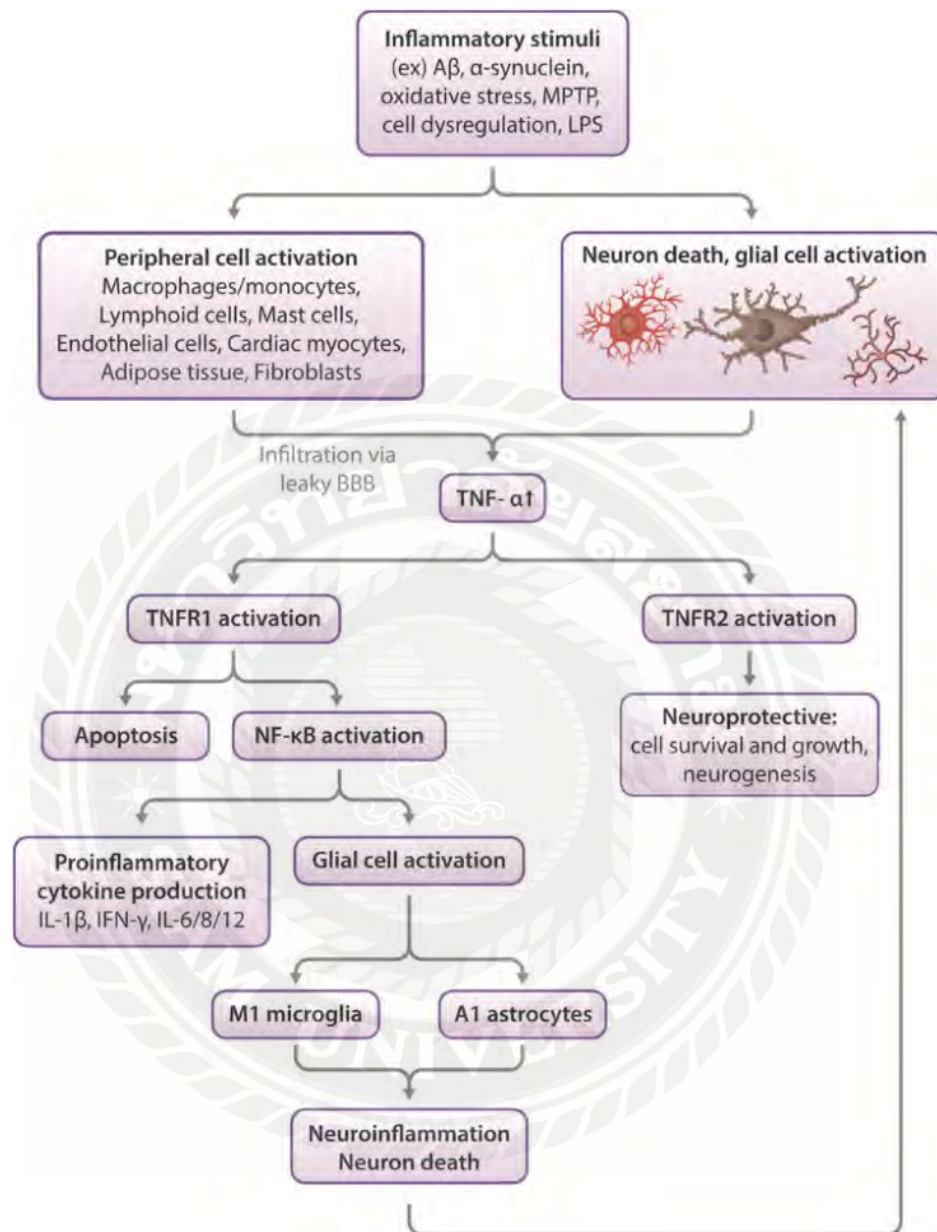
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การอักเสบของระบบประสาทและโรคจิตเวช

การติดเชื้อ การบาดเจ็บ หรือการเผชิญกับความเครียดอย่างต่อเนื่อง เป็นสาเหตุที่ทำให้ระบบประสาทอักเสบและนำไปสู่โรคทางจิตเวชได้ (Bauer and Teixeira, 2021) เมื่อมีสิ่งคุกคาม สมดุลร่างกายหรือได้รับความเครียด แกนควบคุมความเครียดจะทำหน้าที่ปรับสมดุลร่างกายให้ทำงานอย่างปกติ หากเผชิญกับความเครียดอย่างต่อเนื่องอาจส่งผลต่อการรบกวนการทำงานของแกนควบคุมความเครียดและกระตุ้นให้ระบบซิมพาเทติกทำงานมากจนเกินไป ทำให้สารสื่อประสาทกลุ่มแคทีโคลามีน (catecholamine) ได้แก่ นอร์เอพิเนฟรินและอิพิเนฟริน ไปกระตุ้นให้สารชักนำการอักเสบเพิ่มขึ้น pro-inflammatory cytokines (Won et al., 2020) ผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า ความเครียดทำให้ระบบประสาทอักเสบด้วยการเพิ่มขึ้นของสารอินเตอร์ลิวคิน วัน-เบต้าที่หลั่งมาจากเซลล์ประสาทไมโครเกลียและไมโครฟาจ (Wohleb et al., 2011) ยิ่งไปกว่านั้น พบการอักเสบของเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ทาลามัส และไฮโปทาลามัส จากการได้รับความเครียดอย่างต่อเนื่อง (Sugama et al., 2019)

นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณของ TNF-alpha จากการติดเชื้อหรือได้รับบาดเจ็บ สามารถไปกระตุ้นการทำงานของตัวรับ TNFR1 และ TNFR2 ซึ่งไปกระตุ้นกลไกการตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ (apoptosis) ผ่าน NF-KB และนำไปสู่การเพิ่มปริมาณของสารชักนำการอักเสบ pro-inflammatory cytokine และกระตุ้นการทำงานของเกลียเซลล์ ทำให้เซลล์ประสาทเกิดการอักเสบและตายได้ (Jung et al., 2019) ดังแสดงในภาพที่ 2.1

ทั้งนี้มีการเปรียบเทียบการได้รับสาร TNF alpha ความเข้มข้น 63 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว สามารถเหนี่ยวนำให้มีปริมาณสารอักเสบเพิ่มขึ้น โดยไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย ได้แก่ TNF-alpha, อินเตอร์ลิวคิน วัน-เบต้า อินเตอร์ลิวคิน 6 และสารอินเตอร์ลิวคิน 10 เป็นต้น (Biesmans et al., 2015) ดังนั้นการศึกษานี้ก็นำมาแบบจำลองภาวะอักเสบของระบบประสาท ซึ่งได้ทำการวัดฮอร์โมนความเครียดและทดสอบพฤติกรรมประสาท เพื่อยืนยันผลการศึกษานี้ด้วย

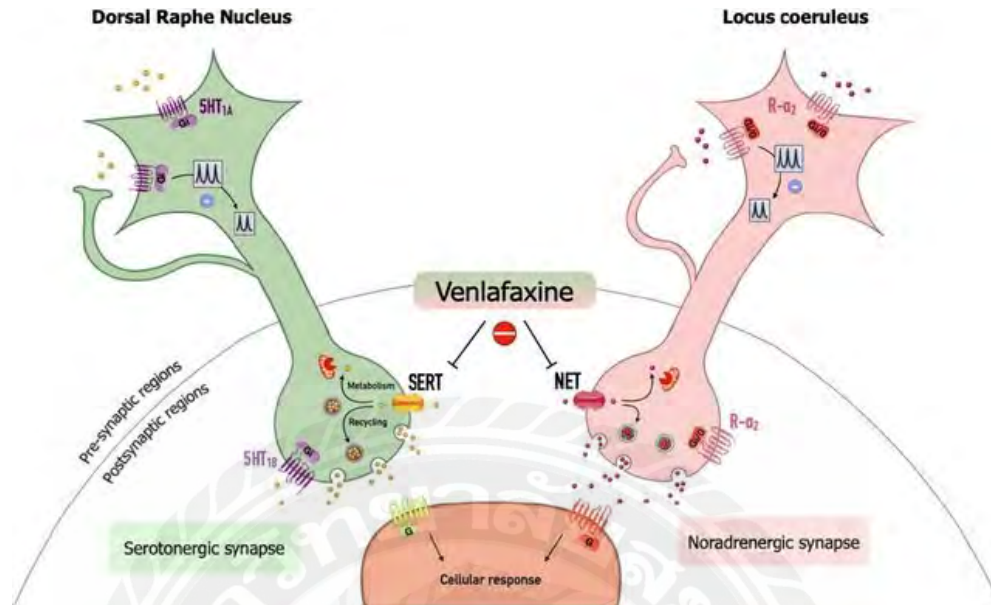


ภาพที่ 2.1 สรีรพยาธิวิทยาการอักเสบของระบบประสาท (Jung et al., 2019)

2.2 ประสิทธิภาพยาต้านการดูดกลับเซโรโทนินและนอร์อิพิเนฟริน

ยาต้านการดูดกลับสารสื่อประสาทเซโรโทนินและนอร์อิพิเนฟริน (serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor, SNRI) คือ ยาเวนลาฟาซีน (venlafaxine) เป็นอนุพันธ์ของสาร bicyclic phenylethylamine โดยหลังจากบริหารยาเข้าไปในร่างกายแล้วจะถูกย่อยและดูดซึมที่ตับ และส่งผลให้มีปริมาณของยาในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นภายใน 2 ชั่วโมง โดยมีค่าการดูดซึม เท่ากับ 45% และมี CYP2D6 ช่วยสลายอนุพันธ์ของยาดังนี้เป็นสาร o-desmethylvenlafaxine ซึ่งการกำจัดยาใช้เวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ทั้งยาเวนลาฟาซีนและอนุพันธ์สาร desmethylvenlafaxine มีประสิทธิภาพในการรักษาภาวะลำไส้แปรปรวนและโรคซึมเศร้า (Dell'Osso et al., 2010, Lapmanee et al., 2017; Sharbafchi et al., 2020) อีกทั้งมีการระบุสรรพคุณการรักษาเพิ่มเติมจากยาต้านความซึมเศร้านั้นคือ ยาเวนลาฟาซีนสามารถช่วยคลายความวิตกกังวลแบบทั่วไปและความกังวลต่อการเข้าสังคมอีกด้วย หากเปรียบเทียบขนาดนี้กับยาต้านความซึมเศร้ากลุ่มอื่น ได้แก่ ไตรไซคลิก (Tricyclic antidepressants, TCAs) เป็นยาต้านเศร้ากลุ่มไตรไซคลิก ยารักษาโรคซึมเศร้า (TCAs), กลุ่มเอ็มเอไอไอ (MAOI, Monoamine Oxidase Inhibitors), ยานูโปรพ็อน (Bupropion) รวมถึงยาในกลุ่ม selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) เช่น fluoxetine พบว่า ยาเวนลาฟาซีนมีความปลอดภัยและความเสี่ยงที่จะกระตุ้นให้ผู้ป่วยอยากทำร้ายตัวเองหรือฆ่าตัวตายน้อยกว่ายาในกลุ่มอื่น โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ขัดขวางการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทเซโรโทนินและนอร์อิพิเนฟรินในการดูดกลับของสารสื่อประสาทเพื่อให้มีปริมาณสารสื่อประสาทเซโรโทนินและนอร์อิพิเนฟรินเพียงพอต่อการทำงานของ post synaptic neurons (Coutens et al., 2022) (ดังภาพที่ 2.2)

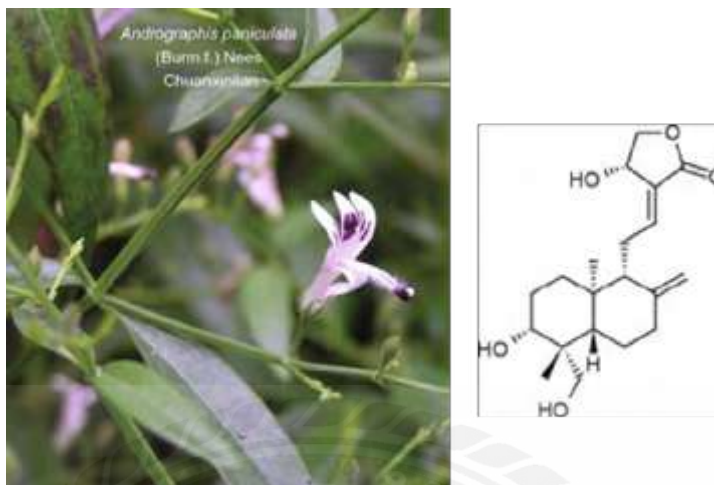
ยิ่งไปกว่านั้นยาในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) หรือยับยั้งกระบวนการอักเสบและลดการสร้างสารอักเสบไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบ เช่น อินเตอร์ลิวคิน-วันเบต้า (IL-1beta) ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (TNF-alpha) และเอนไซม์ cyclooxygenase 2 (COX2) (Hajhashemi et al., 2015; Mahnashi et al., 2022) ผลการรักษาด้วยยาเวนลาฟาซีนสามารถช่วยเพิ่มการสร้างไมอีลินและลดการอักเสบของเซลล์ประสาทในสัตว์ทดลองแบบจำลองโรคปลอกประสาทเสื่อมแข็ง (multiple sclerosis) ร่วมกับภาวะซึมเศร้าและความจำบกพร่อง (Zhang et al., 2019) เป็นต้น



ภาพที่ 2.2 กลไกยาเวนลาฟาคีน (Coutens et al., 2022)

2.3 สรรพคุณของสารแอนโดรกราโฟไลด์และระบบขนส่งลิโปโซมนาโนอิมันชัน

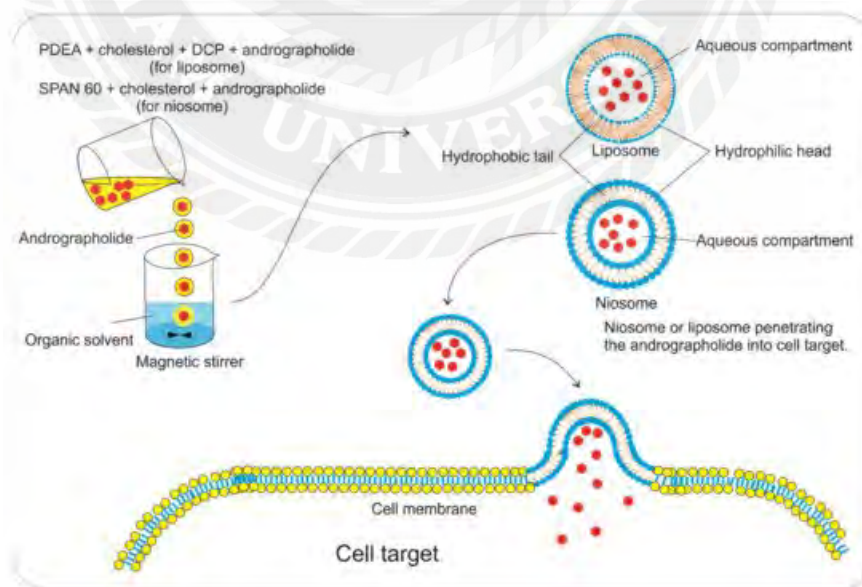
สารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees. ในวงศ์ Acanthaceae) พืชชนิดนี้เป็นพืชสมุนไพรในเอเชียที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอินเดีย จีน และไทย ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของฟ้าทะลายโจร (ภาพที่ 2.3) ลำต้นตั้งตรง ส่วนตรงปลายกิ่งเป็นเหลี่ยม แตกกิ่งเล็กด้านข้างจำนวนมาก ลักษณะเป็นพุ่ม กิ่งก้านมีสีเขียว ใบเป็นใบเดี่ยวออกเรียงตรงข้ามกัน ลักษณะใบรูปไข่รียาว แฉกโคนใบ และปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ แผ่นใบเรียบเกลี้ยงมีสีเขียว ออกดอกเป็นช่อ ตามซอกใบ และปลายกิ่ง ดอกมีขนาดเล็กสีขาว และมีผลคล้ายฝักตั๋ยตั้งแต่พอมและมีขนาดเล็ก สารแอนโดรกราโฟไลด์มีสรรพคุณขจัดความร้อนต่อต้านความเป็นพิษ และลดอาการบวมและการอักเสบ สารแอนโดรกราโฟไลด์มีฤทธิ์ป้องกันระบบประสาทไปจนถึงการต่อต้านเนื้องอกในโรคมะเร็ง เป็นต้น (Mussard et al., 2019)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะพฤกษศาสตร์ของฟ้าทะลายโจรและโครงสร้างเคมีสารแอนโดรกราโฟไลด์ (Casamonti et al., 2019)

ปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรฟ้าทะลายโจรในการรักษา ไข้หวัด ท้องเสียจากการติดเชื้ออย่างแพร่หลาย สารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น ด้านไวรัสไข้หวัด และเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ป้องกันความเป็นพิษของตับ ลดไข้และด้านการอักเสบ เป็นต้น (Dai et al., 2019; Mussard et al., 2019) ผลการศึกษาด้านเภสัชวิทยาพบว่า ฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุของการเป็นหนอง (Zhang et al., 2020) รวมถึงลดการอักเสบด้วยการยับยั้งการถ่ายโอนสัญญาณ NF-KB/MAPK signaling pathway และลดปริมาณสารเหนียวนำการอักเสบอีกด้วย (Li et al., 2017) ผลการศึกษาเภสัชจลศาสตร์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์จากการสกัดฟ้าทะลายโจรในสารละลายเอทานอลผ่านทางปากในหนูแรทสายพันธุ์วิสตาร์และคน พบว่า การดูดซึม (bioavailability) สารแอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 20 มิลลิกรัม/ต่อน้ำหนักตัว เท่ากับ 0.91% ขณะที่ปริมาณ 200 มิลลิกรัม/ต่อน้ำหนักตัว เท่ากับ 0.21% (Panossian et al., 2000) อย่างไรก็ตาม สารแอนโดรกราโฟไลด์มีการดูดซึมต่ำและความสามารถในการละลายน้ำได้ไม่ดี ซึ่งจำกัดการกระจายและการสะสมในร่างกาย นอกจากนี้ สารแอนโดรกราโฟไลด์ไม่เสถียรในสภาพแวดล้อมที่เป็นด่างและกรดในทางเดินอาหาร และมีครึ่งชีวิตที่สั้นจึงถูกกำจัดและลดประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ (Casamonti et al., 2019) ทั้งนี้สารแอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 20 มิลลิกรัม/ต่อน้ำหนักตัวอาจสามารถต้านการอักเสบและอนุมูลอิสระเพื่อบรรเทาอาการการอักเสบจากการติดเชื้อหรือการอักเสบของระบบประสาทได้

ดังนั้นการพัฒนากระบวนการขนส่งสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่เพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ และการซึมผ่านของน้ำจึงมีความสำคัญ เทคโนโลยีเอนแคปซูลเลชัน เป็นกระบวนการที่ของเหลว หรืออนุภาคถูกห่อหุ้มอยู่ในรูปของแคปซูลด้วยพอลิเมอร์เป็นชั้นบางๆ เกิดเป็นไมโครแคปซูลระดับ ไมโครน ชั้นพอลิเมอร์นี้จะเป็นตัวป้องกันหรือปลดปล่อยสารที่สำคัญภายในออกมา โดยทำให้เกิดฟิล์มรอบอนุภาคหรือทำให้เกิดเป็นอิมัลชัน มีความยืดหยุ่นและแข็งแรงเพียงพอ มีความสามารถ ทำให้เกิดอิมัลชัน มีคุณสมบัติในการยึดติดกับคอร์ได้ดีโดยไม่ทำปฏิกิริยากัน มีความหนืดต่ำ เมื่ออยู่ในสถานะของแข็งต้องไม่ขึ้นง่าย นอกจากนี้ยังต้องมีความคงตัวสูง เพื่อทนต่อจากสภาพแวดล้อมต่างๆและปลดปล่อยสารที่สำคัญได้ดี จากผลการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคไมโครและอนุภาคนาโนที่นำมาบรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์ร่วมกับกรดโพลิแลกติก โกลโคติก กรดอัลจินิก และอนุพันธ์กลูแคนสามารถนำมาการบริหารช่องปากและเข้าถึงปอดได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อนุภาคลิโปโซมและนาโนโซมสามารถห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์และปรับความสามารถในการดูดซึม และการกระจายเนื้อเยื่อเป้าหมายเพิ่มขึ้น (Mkam et al., 2022) มากไปกว่านั้นลิโปโซมนาโนอิมัลชันห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ได้มากขึ้น เนื่องด้วยส่วนประกอบของไขมันที่มีทั้งของแข็ง (ไขมัน) และไขมันที่เป็นของเหลว (น้ำมัน) ช่วยการกระจายตัวของไขมันคงที่และป้องกันการแยกตัวของสารแอนโดรกราโฟไลด์ได้ (Bilia et al., 2017) ดังแสดงในภาพที่ 2.4 การศึกษาในครั้งนี้ สารแอนโดรกราโฟไลด์จะถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมัลชันจึงช่วยให้สารมีเสถียรในสภาพแวดล้อมภายในทางเดินอาหารและเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์



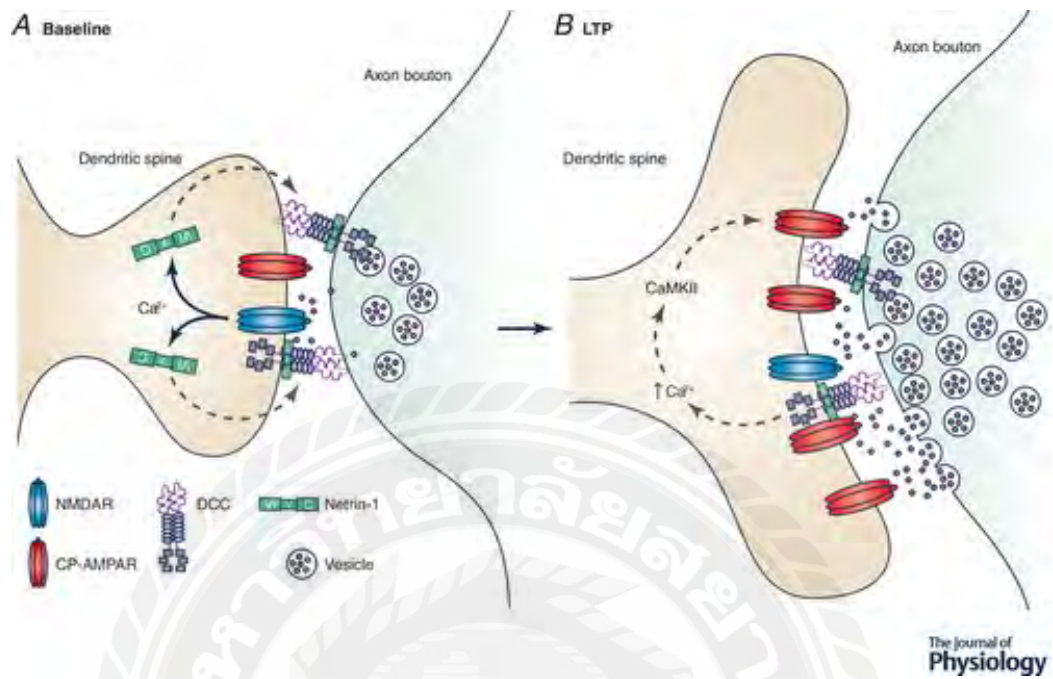
ภาพที่ 2.4 การสังเคราะห์และการขนส่งสารแอนโดรกราโฟไลด์ลิโปโซมนาโนอิมัลชัน (Adiguna et al., 2021)

2.4 ความสามารถในการยืดหยุ่นของเซลล์ประสาทและพฤติกรรมประสาท

ความสามารถในการยืดหยุ่น (brain plasticity) คือ ความสามารถของสมองที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตลอดชีวิตโดยการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ทำให้มีการฟื้นตัวและปรับโครงสร้างตัวเองได้หลังจากอาการบาดเจ็บหรือการเสื่อมของเซลล์ประสาท รวมถึงการแสดงออกทางอารมณ์ พฤติกรรมประสาท และการเรียนรู้ที่ผิดปกติ เช่น โรควาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ และโรคสมาธิสั้น เป็นต้น (Neves et al., 2008; Zhang and Poo, 2010) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการการเรียนรู้หรือมีการจดจำสิ่งใหม่ๆ สมองจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยการสร้างเซลล์ประสาทขึ้นใหม่ เซลล์ประสาทจะเชื่อมต่อกันด้วยซินแนปส์หรือจุดประสานประสาท ซึ่งความแข็งแรงของเส้นใยเซลล์ประสาทนี้ขึ้นอยู่กับการเรียนรู้และฝึกฝน ฉะนั้นการเรียนรู้และฝึกฝนบ่อยครั้งจะยิ่งทำให้การเชื่อมต่อของเซลล์ประสาทแข็งแรงขึ้น และการเชื่อมต่อที่แข็งแรงขึ้นก็จะทำให้ประจุไฟฟ้าเคลื่อนที่ได้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่ความเครียดและการอักเสบของระบบประสาทสามารถลดประสิทธิภาพความยืดหยุ่นของสมองในภาวะวิตกกังวลและซึมเศร้าได้ (Liu et al., 2017; Liu et al., 2020)

ในภาวะปกติกระบวนการเสริมกำลังการส่งสัญญาณระยะยาว (long-term potentiation) เป็นการสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาท โดยกระตุ้นเซลล์ประสาทให้ทำงานพร้อมกัน อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับความยืดหยุ่นของซินแนปส์ (synaptic plasticity) ซึ่งกระบวนการเสริมกำลังการส่งสัญญาณในระยะยาวมีการเชื่อมต่อกันของไซแนปส์แบบเคมี มีการเข้ารหัสโดยการเปลี่ยนระดับการเชื่อมต่อกันของซินแนปส์ กลไกในระดับเซลล์ของเสริมกำลังการส่งสัญญาณในระยะยาว การเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมในเซลล์ประสาทหลังจากการหลั่งสารสื่อประสาทกลูตาเมต มีผลกระตุ้นการหลั่งของสารสื่อประสาทและการทำงานของปฏิกิริยาการกระตุ้น protein kinase A, protein kinase C, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II และ phospholipase C ทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต เพื่อใช้ในการทำงานระดับเซลล์ เมื่อมีการลดลงของระดับแคลเซียมส่งผลให้เกิดลดการส่งสัญญาณ (long-term depression) (ภาพที่ 2.5)

ดังนั้นกระบวนการเสริมกำลังการส่งสัญญาณในระยะยาวนี้จึงเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญในระดับเซลล์ของการสร้างความจำและสามารถถูกรบกวนจากการเผชิญกับความเครียด ซึ่งนำไปสู่ความผิดปกติทางจิตและความจำบกพร่องได้ (Conrad and Winder, 2011; Dong et al., 2015) นอกจากนี้การศึกษาโปรตีนส่งเสริมการสร้างเซลล์ประสาทและการประสานรอยประสาทซินแนปส์ เช่น BDNF, GDNF, NGF synaptophysin และ postsynaptic density 95 สามารถบ่งชี้ความสามารถในยืดหยุ่นของเซลล์ประสาทในสมองได้ (Popova et al., 2017; Glasgow et al., 2020; Gu et al., 2020; Turkmen et al., 2021)



ภาพที่ 2.5 ขบวนการสร้างความจำในสมอง (Glasgow et al., 2020)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 3.1 เพื่อสังเคราะห์และศึกษาความปลอดภัยและการเข้าสู่เซลล์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน

การสังเคราะห์ลิโปโซมนาโนอิมันชันที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์

สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ผลิตจากบริษัท Sigma-Aldrich Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา (product number: 172060) ซึ่งได้รับการควบคุมคุณภาพด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางที่มีประสิทธิภาพสูง (high performance thin-layer chromatography) และจัดเก็บในอุณหภูมิห้อง ตามที่ระบุไว้ในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยสารเคมี (safety data sheet) สารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันถูกผลิตผ่านเครื่องปั่นผสมสารละลายความเร็วสูง (Homogenizer) โดยปรับอัตราส่วนอัตราการใช้ของทั้งเฟสน้ำและน้ำมันเพื่อปรับขนาดของไขมันให้ละเอียด สารลิโปโซมนาโนอิมันชันที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์ถูกปรับให้เหมาะสมกับอัตราการใช้ของทั้งสองเฟส โดยเฟสของน้ำที่เตรียมไว้ผสมกับเฟสตัวทำละลาย ทั้งนี้สารแอนโดรกราโฟไลด์และส่วนประกอบของไขมัน ได้แก่ cholesterol, lecithin และ phospholipid-small peptide molecule ซึ่งละลายอยู่ในสารเอทานอล ลิโปโซมนาโนอิมันชันเกิดขึ้นภายใต้แรงเชิงกลและทำการระเหยแบบหมุนภายใต้แรงดันที่ลดลง ตามลำดับ ทั้งนี้เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยและศักย์ซีตาของลิโปโซมนาโนอิมันชันที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์ถูกประเมินด้วยเครื่องด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK)

ประสิทธิภาพการห่อหุ้มและความสามารถในการบรรจุ

สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชันถูกนำมากรองผ่านเครื่องกรอง Amicon membrane filter (Amicon Ultra-15, Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Germany) ที่ปั่นด้วยความเร็ว 8,000 rpm เป็นระยะเวลา 15 นาที ส่วนของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้มจะถูกกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 μm ก่อนนำไปแยกสารผสมโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแรงดันสูง ความเข้มข้นของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชันคำนวณจากสมการ ร้อยละประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (encapsulation efficiency, EE)

$$\%EE = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100$$

เมื่อ Ci คือ ความเข้มข้นของสารแอนโดรกราโฟไลด์ก่อนผสมกับลิโปโซมนาโนอิมันชัน
Cf คือ ความเข้มข้นของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้ม

การประเมินขนาดและรูปร่าง

ขนาดและรูปร่างของแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชันถูกประเมินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ลิโปโซมนาโนอิมันชันที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน ตามด้วย sonication เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวางตัวอย่างบนตะแกรงทองแดงเคลือบคาร์บอนและประเมินขนาดและรูปร่างของอนุภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ TEM ขนาด 200 kV (Philips CM 20, UK)

การประเมินปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชัน

สารตั้งเคราะห์ที่ได้ถูกนำมาศึกษาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, HPLC) ผ่านคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.1 มิลลิเมตร และความยาว 100 มิลลิเมตร ภายในคอลัมน์นั้นบรรจุวัสดุภาคคงที่ชนิด ไดเมทิลเฮกซะเดซิลไซเลน (dimethyl-n-octadecylsilane) ชนิด C18 ขนาด 2.7 ไมครอน ซึ่งอุณหภูมิของคอลัมน์จะถูกตั้งไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส โดยอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่กำหนดไว้ที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยในกระบวนการนี้จะใช้ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบในปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้น ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-visible detector ซึ่งทำหน้าที่ตรวจวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 223 นาโนเมตร ถัดมาวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ในอนุภาคนาโน เมื่อกำหนดอัตราส่วนของตัวทำละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยน้ำผสม 0.1% กรดฟอร์มิก และอะซิโตรไนไตรล์ผสม 0.1% กรดฟอร์มิก โดยมีระยะเวลาในการชะสารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์ในลักษณะของ gradient elution เป็นเวลา 10 นาที แล้วหาค่าเฉลี่ย โดยที่ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% relative standard deviation)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทมนุษย์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดัลเบ็ค โคส โมดิฟายด์ อีเกิลส์ (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) ให้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีความชื้นร้อยละ 95 และอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24

ชั่วโมง ทั้งนี้สารลิโปโซมนาโนอิมันชัน (Blank, สารที่กักเก็บในอนุภาค) สารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andro, สารเดี่ยว) และสารแอนโดรกราโฟไลด์ลิโปโซมนาโนอิมันชัน (Andro-NLCs) ถูกนำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 0.00, 0.49, 0.98, 1.95, 3.91, 7.82, 15.64, 31.28, 62.56, 125 และ 250 ppM ตามลำดับ เพื่อใช้ในการทดลอง จากนั้นเติมสารละลายของสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 100 μ l แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์กับสารทดสอบในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นหาค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; MTT) โดยการเติมสารละลายเอ็มทีที (MTT) ลงไปในจานเพาะเลี้ยง (1 mg/ml in PBS) แล้วล้างด้วยสาร formazan crystals ที่ผสมกับสาร 100 μ l DMSO แล้วนำออกมาวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Biotek, USA) บันทึกค่าฟลูออเรสเซนส์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีร้อยละการมีชีวิตมากกว่า 80 (ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์) (Bhubhanil et al., 2021)

การเข้าสู่เซลล์ของลิโปโซมนาโนอิมันชันที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์

ลิโปโซมนาโนอิมันชันที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์ถูกนำมาติดฉลากเรืองแสงเพื่อติดตามการเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (Molecular Probes® Dil dye, Invitrogen™ Dil Stain (1,1'-Diocadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate ('Dil'; DiIC18(3))) โดยบ่มในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงเป็นช่วงเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แล้วประเมินด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus IX71, Olympus, PA, USA) และวิเคราะห์ความคงตัวของสารเรืองแสงหลังจากนำเซลล์มาผสมกับสารลดแรงตึงผิวที่จะไปสลายเยื่อหุ้มเซลล์และมีเอนไซม์เป็นระยะเวลา 15 นาที (Promega, Madison USA) ด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ 540-570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Biotek, USA) (Balyasnikova et al., 2022)

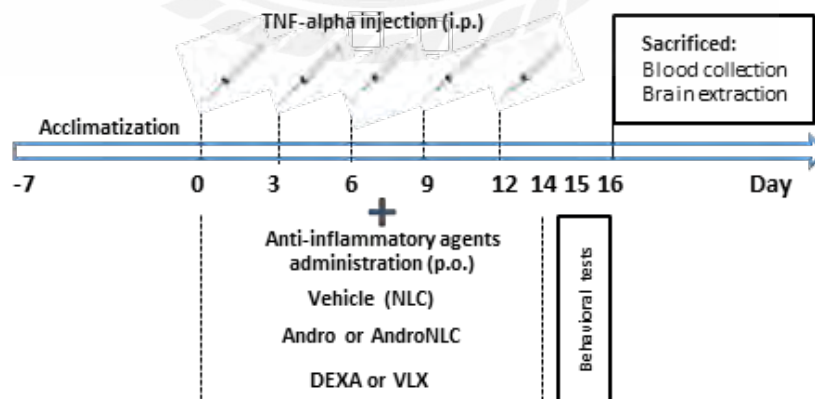
ตอนที่ 2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันต่อการลดการอักเสบของระบบประสาท การแสดงออกของพฤติกรรม และการเปลี่ยนแปลงความยืดหยุ่นของสมองสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลอง

หนูเมาส์ สายพันธุ์ C57BL/6 เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 15–20 กรัม จากบริษัท โนมูระสยามอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด หนูแต่ละตัวเลี้ยงในกรงซึ่งอยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และความชื้น $55 \pm 5\%$ ด้วยแสงสว่างตามวงจรเวลากลางวันกลางคืนรอบละ 12 ชั่วโมง หนูทุกตัวได้รับอาหารและน้ำที่มาตรฐาน น้ำหนักของหนูและปริมาณอาหารที่กินจะทำการบันทึกทุกวัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด สัตว์ทดลองเป็นระยะเวลา 7 วัน ถูกสุ่มแบ่งกลุ่มทดลอง โครงการวิจัยนี้ใช้จำนวนสัตว์ทดลองและระยะเวลาการทดลองต่อสัตว์อย่างน้อยที่สุด

การดำเนินงานทุกขั้นตอนได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับการดูแลและการใช้สัตว์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โดยเพิ่มจำนวนสัตว์ทดลองและกลุ่มทดลองในแบบขออนุมัติส่วนแก้ไขเพิ่มเติมโครงการวิจัยเลขที่ 021/2021 (ภาพที่ 3.1) โครงการวิจัยนี้ใช้หนูจำนวน 54 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 9 ตัว ได้แก่

1. กลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก (control)
2. กลุ่มระบบประสาทอักเสบที่ได้รับยาหลอก (negative control)
3. กลุ่มระบบประสาทอักเสบที่ได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์
4. กลุ่มระบบประสาทอักเสบที่ได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ลิโปโซมนาโนอิมันชัน
5. กลุ่มระบบประสาทอักเสบที่ได้รับยาต้านการอักเสบเดกซามทาโซน (dexamethasone)
6. กลุ่มระบบประสาทอักเสบที่ได้รับยาต้านความซึมเศร้าเวนลาฟาซิน (venlafaxine)



ภาพที่ 3.1 แผนดำเนินงานวิจัยในสัตว์ทดลอง

การเหนี่ยวนำให้ระบบประสาทอักเสบ

หนูเมาส์ถูกเหนี่ยวนำให้ระบบประสาทอักเสบด้วยสารไซโตไคน์ซึ่กนำการอักเสบ

recombinant mouse TNF-alpha (catalog number T7539, Sigma, St Louis, MO, USA) ขนาด 63 ไมโครกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งเป็นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบอย่างต่อเนื่องโดยทำการฉีดสารผ่านทางช่องท้อง ทุก 3 วัน รวมจำนวน 5 ครั้ง (Biesmans et al., 2015)

การบริหารสารต้านการอักเสบ

หนูแต่ละตัวถูกป้อนสารแอนโดรกราโฟไลด์หรือสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมมาโนอิมันชัน ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวหรือยาต้านการอักเสบเดกซามาธาโซน (dexamethasone) ขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และยาต้านการอักเสบเซโรโทนินและนอร์อิพิเนพริน เวนลาฟาซีน (venlafaxine) ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ทุกวันเป็นระยะเวลาติดต่อกันนาน 14 วัน โดยทำการป้อน ในเวลา 15.00–16.00 น. ขนาดของยาและสารต้านการอักเสบที่ทำการป้อนได้อ้างอิงมาจากการศึกษาของ Thakur et al., 2014; Jia et al., 2018; Lapmanee et al., 2017; 2022

การทดสอบพฤติกรรม

พฤติกรรมวิตกกังวลและการเคลื่อนไหวร่างกาย

เครื่องมือนี้เป็นกล่องพลาสติกทาสีดำ ยาว 76 ซม. กว้าง 57 ซม. สูง 35 ซม. พื้นกล่องจัดเป็นตารางโดยแต่ละช่องมีขนาดด้านละ 9.5 ซม. จำนวน 48 ช่อง แบ่งออกเป็นบริเวณส่วนใน (inner zone) และส่วนรอบนอก (outer zone) การศึกษานี้ใช้สำหรับการประเมินพฤติกรรมวิตกกังวลและความสามารถในการเคลื่อนที่ในพื้นที่เปิดโล่งด้วยการประเมินจำนวนครั้งของการข้ามช่องในเวลาที่กำหนด (crossed lines) หนูที่มีความกังวลมากจะชอบเคลื่อนที่ชิดผนังและมีการสำรวจสถานที่และใช้เวลาอยู่ในบริเวณส่วนนอกของพื้นที่เพิ่มขึ้น ขั้นตอนของการทดสอบ หนูจะถูกวางที่มุมของกล่องหันหน้าเข้าสู่จุดกึ่งกลาง จากนั้นบันทึกพฤติกรรมและกิจกรรมขณะหนูอยู่ในเครื่องมือนี้ได้แก่ จำนวนช่องที่หนูวิ่งข้ามพื้นที่ในเวลา 30 วินาที ระยะเวลาที่อยู่ในส่วนนอกหรือในและจำนวนช่องตลอดระยะเวลาทั้งหมด 5 นาที (total crossed lines) (Lapmanee et al., 2017; 2022)

พฤติกรรมซึ่มเส้าสิ้นหวัง (forced swimming)

หนูแต่ละตัวถูกบังคับให้ว่ายน้ำที่มีอุณหภูมิ 24 - 25°C ในสระพลาสติกทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 ซม. สูง 45 ซม. โดยวันแรกหนูถูกฝึกให้คุ้นชินกับการว่ายน้ำก่อน เป็นเวลา 15 นาที 24 ชั่วโมงต่อมา จะเริ่มทำการทดสอบนาน 6 นาที โดยให้ 1 นาทีแรก สำหรับการปรับตัวกับการเผชิญหน้ากับน้ำ 5 นาทีที่เหลือจะถูกใช้เพื่อบันทึกพฤติกรรมการอยู่รอดขณะว่ายน้ำ พฤติกรรมการพุงตัวลอยนิ่งบ่งชี้ภาวะสิ้นหวัง (Lapmanee et al., 2017)

พฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในการแยกแยะวัตถุ (novel object recognition, NOR)

การทดสอบความสามารถในการแยกแยะวัตถุ NOR เป็นกล่องพลาสติกสี่ด้านกว้าง 63 ซม. ยาว 63 ซม. และสูง 45 ซม. โดยก่อนทำการทดสอบ หนูจะนำมาปล่อยในกล่องเปล่า เพื่อให้คุ้นชินกับสภาพสิ่งแวดล้อมเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 รอบต่อวัน แล้วทำการทดสอบการแยกแยะและการจดจำวัตถุ โดยปล่อยหนูลงในกล่องที่มีอุปกรณ์ทับกระดาษทำมาจากเซรามิกรูปทรงเหมือนกัน (ขนาด 3 ซม. ยาว 3 ซม. และสูง 7 ซม.) จำนวน 2 ชิ้น วางห่างกันประมาณ 10 ซม. นาน 3 นาที บันทึกพฤติกรรมการสำรวจวัตถุ จากนั้น 1 ชม. ต่อมา ทำการเปลี่ยนอุปกรณ์ทับกระดาษเป็นแจกัน (ขนาด 5 ซม. ยาว 5 ซม. และสูง 12 ซม.) จำนวน 1 ชิ้น แล้วปล่อยหนูลงในกล่องเพื่อทดสอบการแยกแยะและจดจำวัตถุเป็นเวลา 3 นาที หนูที่มีความจำบกพร่องจะใช้เวลาในสำรวจกับวัตถุที่คุ้นชินมากกว่าวัตถุใหม่ (Lapmanee et al., 2017; 2022)

การสลบและเก็บอวัยวะตัวอย่าง

เมื่อสิ้นสุดการศึกษา หนูแต่ละตัวถูกทำให้สลบด้วย 5% isoflurane และทำการเก็บเลือดจากหัวใจ จากนั้นเก็บสมอง เพื่อทำการศึกษาระดับปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและสารอักเสบ และปริมาณโปรตีนบ่งชี้ความยืดหยุ่นของเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ตามลำดับ

การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและสารอักเสบ

เลือดถูกนำมาปั่นให้ตกตะกอนและนำส่วนของซีรัมมาวัดปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและเนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัสนำมาวัดสารบ่งชี้การอักเสบ ได้แก่ สารไซโตไคน์และสารชักนำการอักเสบ tumor necrosis factor (TNF)-alpha และ IL-6 ถูกตรวจวัดด้วยเทคนิคอีไลซ่า (Enzyme linked immunosorbent assay; ELISA) โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (Immunodiagnostic Systems Ltd, Tyne and Wear, UK; Merck Millipore, San Francisco, California, USA) และวัดผลวิเคราะห์หลังจากนำเข้าเครื่องไมโครเพลทเพื่อทดสอบค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (Fathy et al., 2021; Lapmanee et al., 2022)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีนส่งเสริมการสร้างเซลล์ประสาทในสมอง

สมองส่วนฮิปโปแคมปัสถูกนำมาแยก messenger RNA (mRNA) ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปตามวิธีการที่ผู้ผลิตกำหนด DNA extraction kit (Fermentas, Thermo Scientific) จากนั้นวัดความเข้มข้นของ total RNA ด้วยเครื่อง NanoDrop2000 spectrophotometer ศึกษาการแสดงออกของ mRNA ด้วยวิธี Real-time PCR แล้วศึกษาการแสดงออกของยีนส่งเสริมการสร้างเซลล์ประสาทในสมองที่สนใจ ได้แก่ BDNF, TrkB receptor, alpha-pro-GDNF และ beta-pro-GDNF โดยยีน GAPDH เป็นตัวควบคุมภายในถูกนำมาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของยีนเป้าหมาย ดังที่แสดงในตารางที่ 3.1 ทั้งนี้ทำการศึกษายีนตามวิธีการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณยีนของ Bhubhanil et al., 2021

ตารางที่ 3.1 รายการไพรเมอร์ในการศึกษายีนในสมองหนูเมาส์

Target gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Reference
BDNF	GCCCATGAAAGAAGTAAACGTCC	AGTGTGAGCCAGTGATGTCGTC	Li et al., 2022
TrkB receptor	AACGGAGACTACACCCTGATGG	GCAATCACCACCACGGCATA	Li et al., 2022
alpha-pro-GDNF	GCGACCTTTCCTCTGGAAT	CTTCGCGCTGACCAGTGA	Gu et al., 2020
Beta-GDNF	CGCCGCCAATATGCCTGAA	GCCGCTTGTTTATCTGGTGACCTTTT	Gu et al., 2020
GAPDH	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGAC	AGACAACCTGGTCCTCAGTGATAG	Fathy et al., 2021

ปริมาณโปรตีนส่งเสริมการสร้างเซลล์ประสาทในสมอง

หลังจากการทดสอบพฤติกรรมจะทำการเก็บสมองหนูจากทุกกลุ่มการทดลอง ทำการแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ตามวิธีการของ Heffner และคณะปี 1980 และยืนยันตำแหน่งส่วนของสมองโดยอ้างอิงจาก Paxinos and Watson ปี 2007 สมองส่วนฮิปโปแคมปัสจะถูกบดละเอียดร่วมกับสารละลาย RIPA (abcam, UK) แล้วนำของเหลวที่ได้จากการสกัดเนื้อสมองไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นให้ตกตะกอน จากนั้นนำ supernatant ที่ได้ลงใน polyacrylamide gel ซึ่งประกอบด้วย 4% stacking gel และ 10% resolving gel กระแสไฟฟ้าที่ใช้สำหรับ electrophoresis คือ 100 V ใช้เวลา 2.5 ชั่วโมง ต่อมาย้ายโปรตีนทั้งหมดจาก polyacrylamide gel ไปยัง PVDF membrane ที่แช่ด้วย methanol แล้วล้างให้สะอาด จากนั้นนำแผ่นฟองน้ำประกอปกับอุปกรณ์ขนส่งโปรตีนในสารละลาย Tris buffer saline แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า 80 V เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ซึ่งจะนำโปรตีนมาอยู่บน PVDF membrane ไปเก็บไว้ที่ 4°C เพื่อ immunodetection จากนั้นแช่ใน blocking solution ด้วย 5% skim milk เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วย primary antibody ซึ่งใช้ความเข้มข้นตามที่แสดงไว้ในตารางสรุปการใช้แอนติบอดี ที่ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.2) ถัดมาล้างด้วยสารละลาย Tris buffer saline+0.05% Tween 20 (TBST) จำนวน 3 ครั้ง

ๆ ละ 10 นาที จากนั้นตามด้วย secondary antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลาย TBST 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที วัดปริมาณโปรตีนได้จากการถ่ายภาพของแถบ โปรตีนที่ได้จากขั้นตอน immunodetection ด้วยฟิล์ม X-ray และเครื่องสแกนแถบ โปรตีน แล้ววิเคราะห์ optical density โดยใช้โปรแกรม ImageJ (Lapmanee et al., 2022)

ตารางที่ 3.2 รายการแอนติบอดีในการศึกษาปริมาณ โปรตีนในสมองหนูเมาส์

Antibody	Manufacturer	Dilution	Reference
Rabbit BDNF polyclonal antibody	Invitrogen/Cat #PA1-18357	1:1,000	Fathy et al., 2021
Rabbit TrkB monoclonal antibody	Invitrogen/Cat #M5-14903	1:1,000	Kucharava et al., 2020
Rabbit GDNF polyclonal antibody	Invitrogen/Cat #PA5-89957	1:1,000	Fathy et al., 2021
Mouse GAPDH monoclonal antibody	Invitrogen/Cat #39-8600	1:2,000	Panda et al., 2017
Goat anti-mouse IgG HRP	Abcam/Cat #ab97023	1:1,000	Whittle et al., 2022
Goat anti-rabbit IgG HRP	Abcam/Cat #ab6721	1:1,000	Tang et al., 2022

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลของการศึกษาแสดงในรูปค่าเฉลี่ยและค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Mean±SEM) การเปรียบเทียบระหว่าง 2 ข้อมูลใช้วิธี unpaired student's t-test และการเปรียบเทียบข้อมูลตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไปด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) กำหนดให้ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่ำกว่า 0.05 ($P < 0.05$) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรม GraphPad Prism 10

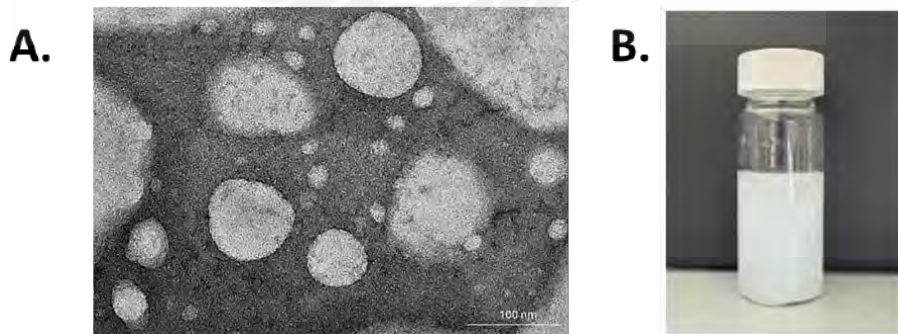
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ลักษณะสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน

ลักษณะและขนาดของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน (AndroNLCs) เป็นทรงกลม ดังภาพที่ 4.1A ได้มาจากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) ซึ่งใช้ในการมองเห็น โครงสร้างในระดับนาโนเมตร ขนาดอนุภาค และลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนกักเก็บสารสกัดฟ้าทะลายโจรเป็นสีขาวขุ่น (ภาพที่ 4.1B) ทั้งนี้ความค่าที่ของการห่อหุ้มจากค่าประจุไฟฟ้า (zeta potential) ค่ากระจายตัว (polydispersity index; PDI) ของสาร AndroNLCs ด้วยวิธีเทคนิควัดการกระเจิงของความเข้มแสง (Dynamic light scattering; Nanosizer, Malvern, UK) โดยการเจือจางตัวอย่างอนุภาคนาโน (ประมาณ 20 ไมโครลิตร) ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกรอง 0.22 ไมครอน (ประมาณ 1 มิลลิลิตร) วัดที่ อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดค่ากรด-ด่างเท่ากับ 5.12 ± 0.00 และขนาดของอนุภาคและการกระจายตัวของอนุภาคนาโนที่เตรียมได้ในวันที่ทำการสังเคราะห์สาร AndroNLCs โดยขนาดของอนุภาคและค่าการกระจายตัวแสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ผลการศึกษา พบว่า ขนาดสาร AndroNLCs มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 131.40 ± 1.30 nm โดยมีค่าการประจุ ประจุไฟฟ้า -33.33 ± 1.03 mV ค่าการกระจายตัวของอนุภาคที่ดี คือ 0.17 ± 0.02 โดยค่าการกระจายตัวของอนุภาคดังกล่าวสามารถยืนยันได้ถึงความสามารถในการกระจายตัวในน้ำของอนุภาคนาโนและมีประจุเป็นบวกสูงซึ่งมีคุณสมบัติยึดติดเยื่อเมือกได้ดี



ภาพที่ 4.1 โครงสร้างอนุภาคนาโนที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์และผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 4.1 ขนาดและค่าการกระจายตัวของอนุภาคนาโนนำส่งสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร

อนุภาค	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าการกระจายตัวอนุภาค	ประจุ Zeta-potential (mV)
อนุภาคไม่มีสารสกัด (Blank)	125.40±0.90	0.18±0.01	25.11±0.39
อนุภาคกักเก็บสาร (AndroNLCs)	131.40±1.30	0.17±0.02	-33.33±1.03

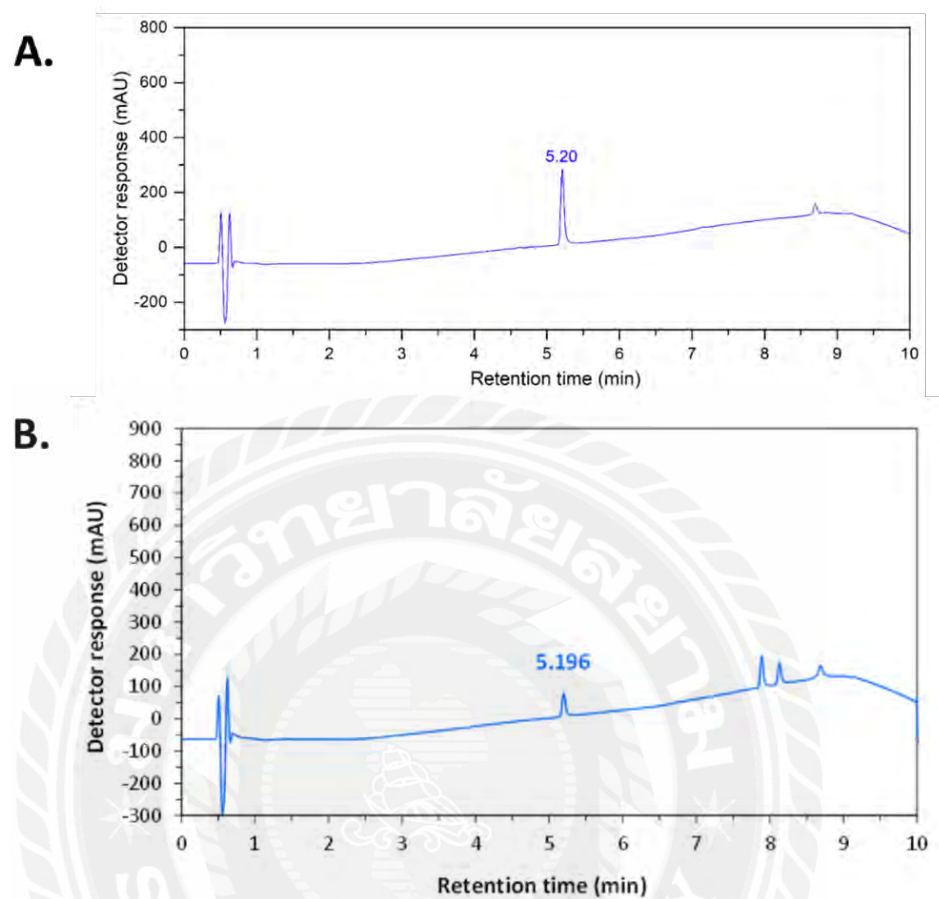
4.2 ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์

สาร AndroNLCs ถูกนำมากรองผ่านเครื่องกรองตัวอย่างทางชีวภาพ Amicon membrane filter (Amicon Ultra-15, Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Germany) ที่ บั น ดั ้วย ความเร็วสูง โดยส่วนของสารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andro) ที่ไม่ได้ถูกห่อหุ้มถูกนำมากรองผ่านแผ่นกรองขนาดไมครอน ก่อนนำไปแยกสารผสมโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลวแรงดันสูง ความเข้มข้นของสาร AndroNLCs คำนวณจากสมการ ร้อยละประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (encapsulation efficiency) ซึ่งผลการศึกษพบว่า ประสิทธิภาพการห่อหุ้มร้อยละ 89.11 ± 0.15

4.3 ปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร AndroNLCs ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 223 นาโนเมตร แสดงที่เวลา 5.2 นาที ดังแสดงในภาพที่ 4.2A ขณะที่สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชันแสดงที่ 5.196 นาที (ภาพที่ 4.2B) ซึ่งแสดงถึงความใกล้เคียงของเวลาที่พิกปรากฏระหว่างสารมาตรฐานและสารห่อหุ้ม

ทั้งนี้ค่าพื้นที่ใต้พิกของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้สมการเชิงเส้นของสารละลายมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ คือ $y = 18.044x + 12.361$ ($R^2 = 0.9991$) ซึ่งแสดงถึงความเป็นเชิงเส้นสูงของการตอบสนองระหว่างความเข้มข้นของสารละลายและค่าพื้นที่ใต้พิก



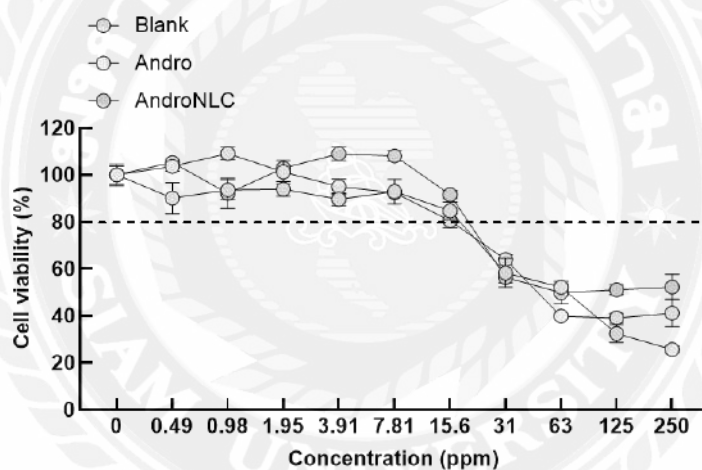
ภาพที่ 4.2 โครมาโทแกรมของสารแอนโดรกราโฟไลด์

4.4 ผลความปลอดภัยของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชัน

ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร Blank, Andro และสาร AndroNLCs ได้รับการประเมินในเซลล์มะเร็งประสาทมนุษย์ SH-SY5Y ในหลายความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้นต่ำ (0.00 ถึง 15.60 ppm) ก่อนการบ่มสารเซลล์ทั้งหมดแสดงการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ที่สูงกว่า 80% อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น การมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างชัดเจน โดยเฉพาะในสาร Blank และสาร Andro เช่น ที่ความเข้มข้น 31 ppm การมีชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือ $58.37 \pm 6.14\%$ สำหรับ สาร Blank และ $64.08 \pm 2.07\%$ สำหรับ สาร Andro ขณะที่สาร AndroNLCs ยังคงมีการมีชีวิตของเซลล์ที่สูงกว่า อยู่ที่ $56.48 \pm 2.19\%$ แนวโน้มนี้ยังคงอยู่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น โดยการมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยสาร Blank ลดลงเหลือ $25.67 \pm 1.50\%$, สาร Andro เหลือ $41.25 \pm 5.90\%$, และสาร AndroNLCs ลดลงเหลือ $52.33 \pm 5.39\%$ ที่ความเข้มข้นสูงสุด 250 ppm ที่น่าสังเกต คือ สาร

AndroNLCs แสดงผลการทำงานที่ดีกว่า Blank และ Andro โดยมีการลดลงของการมีชีวิตของเซลล์ที่ไม่รุนแรงเท่าที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4.3)

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สาร AndroNLCs มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลดลง ความเข้มข้นระหว่าง 7.8 ถึง 15.6 ppm ของ AndroNLCs เพิ่มการมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งบ่งชี้ว่า 10 ppm หรือ 10 mg/kg อาจเป็นขนาดยาที่มีแนวโน้มและปลอดภัยสำหรับการศึกษาทางสัตว์ทดลอง สำหรับการศึกษานี้สามารถพิจารณาใช้ขนาดยาถึง 10 เท่าของขนาดยาที่ปลอดภัย โดยประมาณ 1.0 ppm หรือ 10 mg/kg ซึ่งเป็นปริมาณที่มากพอต่อชีวปริมาณออกฤทธิ์และดูดซึมในระหว่างที่มีการกำจัดสารออกจากร่างกาย (oral bioavailability) ยิ่งไปกว่านั้นสาร Andro ในรูปแบบปกติ ขนาด 10 mg/kg เป็นความเข้มข้นที่สามารถลดการอักเสบและพฤติกรรมวิตกกังวลของสัตว์ทดลอง จึงนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในงานวิจัยนี้



ภาพที่ 4.3 ความเป็นพิษของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมัลชัน

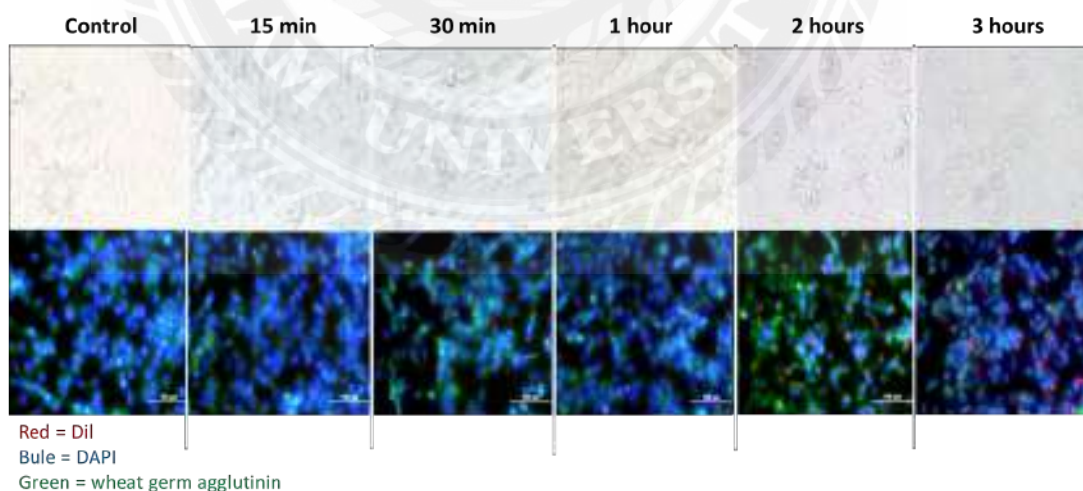
4.5 ผลการเข้าสู่เซลล์ของลิโปโซมนาโนอิมัลชันที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์

เนื่องด้วยสาร Andro รูปแบบปกติไม่สามารถละลายน้ำจึงไม่สามารถทำการศึกษาการเข้าสู่เซลล์ (internalization) อีกทั้งงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการพัฒนากระบวนการขนส่งสารสำคัญด้วยลิโปโซมนาโนอิมัลชัน ฉะนั้นสาร AndroNLCs จึงถูกนำมาติดฉลากเรืองแสงเพื่อติดตามการเข้าสู่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ผลการศึกษาทั้งการย้อมสีและปริมาณสาร Andro ด้วยการวัดค่า fluorescent intensity แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเข้าสู่เซลล์ของลิโปโซมนาโนอิมัลชันที่บรรจุสาร Andro และการสะสมของสารในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง การย้อมติดสีเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงถูกย้อมด้วยสีต่างๆ เพื่อช่วยติดตามการเข้าสู่เซลล์ของลิโปโซมนาโนอิมัลชันที่บรรจุ Andro ซึ่งสาร

DAPI (สีฟ้า) แสดงนิวเคลียสของเซลล์ สารWheat germ agglutinin (WGA, สีเขียว) แสดงเยื่อหุ้มเซลล์ และสาร Dil dye (สีแดง) แสดงลิโปโซมนาโนอิมัลชันที่บรรจุสาร Andro โดยการติดตามการเข้าสู่เซลล์เริ่มตั้งแต่ช่วงเวลา 15 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง ผลจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (ดังภาพที่ 4.4) แสดงให้เห็นถึง การเข้าสู่เซลล์ของสาร Dil dye เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป โดยที่เวลา 15 นาที มีการสะสมของลิโปโซมอยู่รอบเยื่อหุ้มเซลล์และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อถึงเวลา 3 ชั่วโมง ลิโปโซมได้เข้าสู่เซลล์และกระจายอยู่ในบริเวณนิวเคลียส

ทั้งนี้การวัดปริมาณสาร Andro ในเซลล์แสดงให้เห็นแนวโน้มการสะสมของสารในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นตามเวลา โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณเฉลี่ยของสาร Andro ที่เข้าสู่เซลล์ใน 15 นาที มีปริมาณ Andro เท่ากับ 72.00 ± 6.03 เวลา 30 นาที มี 134.33 ± 1.20 เวลา 1 ชั่วโมง มี 250.33 ± 21.83 เวลา 2 ชั่วโมง มี 358 ± 40.67 และเวลา 3 ชั่วโมง มี 502.67 ± 64.38 ตามลำดับ

ฉะนั้นการข้อมสีแสดงให้เห็นว่าการเข้าสู่เซลล์ของลิโปโซมนาโนอิมัลชันเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนตามเวลา โดยเฉพาะหลังจาก 3 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดปริมาณสาร Andro ที่สะสมในเซลล์ที่มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ปริมาณของสาร Andro ในเซลล์เพิ่มจาก 72 หน่วยที่ 15 นาที ไปจนถึง 502.67 หน่วยที่ 3 ชั่วโมง ผลการข้อมสีและการวัดปริมาณนี้ชี้ให้เห็นว่าลิโปโซมนาโนอิมัลชันที่บรรจุสารแอนโดรกราโฟไลด์สามารถเข้าสู่เซลล์และสะสมในเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 4.4 การเข้าสู่เซลล์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมัลชัน

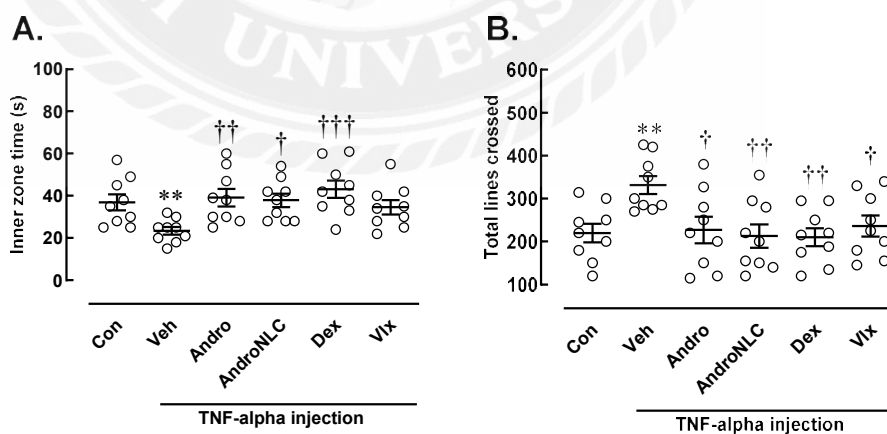
4.6 ผลสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชันต่อการลดการอักเสบของระบบประสาทและประสาทพฤติกรรม

พฤติกรรมวิตกกังวลและการเคลื่อนไหวร่างกาย

หนูที่ได้รับการฉีดสารชักนำการอักเสบ TNF-alpha (Veh) แสดงพฤติกรรมวิตกกังวลและการเคลื่อนไหวร่างกายผิดปกติ (ภาพที่ 4.5A-B) ซึ่งหนูกลุ่มนี้ใช้เวลาที่อยู่ในโซนด้านในสะท้อนถึงระยะเวลาที่กล้าเผชิญในพื้นที่โล่งกว้าง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า หนูอักเสบที่ได้รับยาปลอมนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการใช้เวลาที่อยู่ในโซนด้านใน ($p = 0.007$) และแสดงพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของร่างกายโดยการนับจำนวนเส้นที่สัตว์ข้ามภายในระยะเวลา 5 นาที ซึ่งมีจำนวนมากกว่าหนูกลุ่มปกตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.009$)

ขณะที่กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารลดการอักเสบ พบว่า การรักษายางกลุ่ม เช่น สารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน (AndroNLC) และยาต้านการอักเสบเดกซาเมทาโซน (Dex) สามารถช่วยลดความวิตกกังวลโดยมีระยะเวลาภายในโซนด้านในเพิ่มขึ้น ($p = 0.003$) และลดการเพิ่มขึ้นของจำนวนเส้นที่ข้ามผ่านภายในกล่องทดสอบการเคลื่อนไหว ($p = 0.008$) อย่างนัยมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มยาปลอม เช่นเดียวกันกับสารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andro) และยาเวนลาฟาซีน (Vlx)

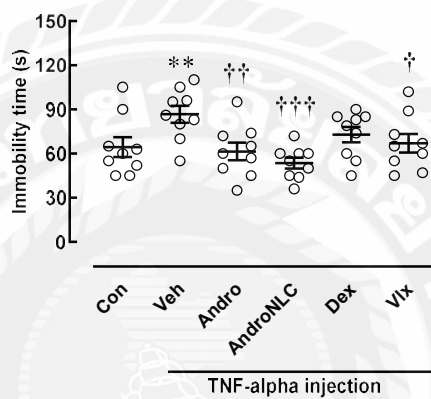
ดังนั้นผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า สารลดการอักเสบ ได้แก่ Andro, AndroNLC และ Dex มีฤทธิ์ลดความวิตกกังวลและบรรเทาการเคลื่อนไหวร่างกายที่ผิดปกติในหนูเมาส์ที่ถูกชักนำให้อักเสบด้วยสาร TNF-alpha



ภาพที่ 4.5 ผลของสารลดการอักเสบต่อพฤติกรรมวิตกกังวลและการเคลื่อนไหวร่างกาย

พฤติกรรมซึมเศร้าสิ้นหวัง

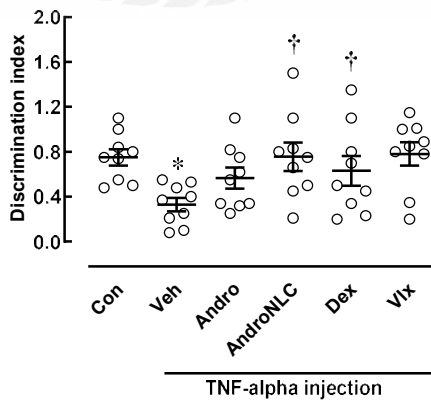
หนูอึกเสบที่รับยาปลอม (Veh) แสดงพฤติกรรมพุงตัวลอยนึ่งในการทดสอบให้ว่ายน้ำในพื้นที่ยกัคมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.005$) ทั้งนี้ผลการรักษาด้วยสารลดการอึกเสบ ได้แก่ สารแอนโดรกราไฟไลด์ (Andro), สารแอนโดรกราไฟไลด์ในลิปโซมนาโนอิมันชัน (AndroNLC) และยาเวนลาฟาซิน (Vix) สามารถลดระยะเวลาพุงตัวดึกว่ากลุ่มที่รับยาปลอม ($p = 0.005$) ดังนั้น ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า ยาลดการอึกเสบ ได้แก่ Andro, AndroNLC และยา Vix มีฤทธิ์ลดอาการซึมเศร้า ดังแสดงในภาพ 4.6



ภาพที่ 4.6 ผลของสารลดการอึกเสบต่อพฤติกรรมซึมเศร้า

ความจำในการแยกแยะวัตถุ

มากไปกว่านั้น หนูที่ได้ถูกชักนำให้เกิดการอึกเสบและได้รับยาปลอม (Veh) มีความจำบกพร่องในการแยกแยะวัตถุใหม่ โดยดัชนีการจดจำลดลงน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($p = 0.024$) ทั้งนี้สาร AndroNLC สามารถบรรเทาการจดจำบกพร่องได้ดีกว่ากลุ่ม Veh ซึ่งผลการศึกษานี้เช่นเดียวกันกับการได้รับยาลดอึกเสบมาตรฐานเดกซามेटาโซน (Dex, $p = 0.034$) ดังภาพที่ 4.7

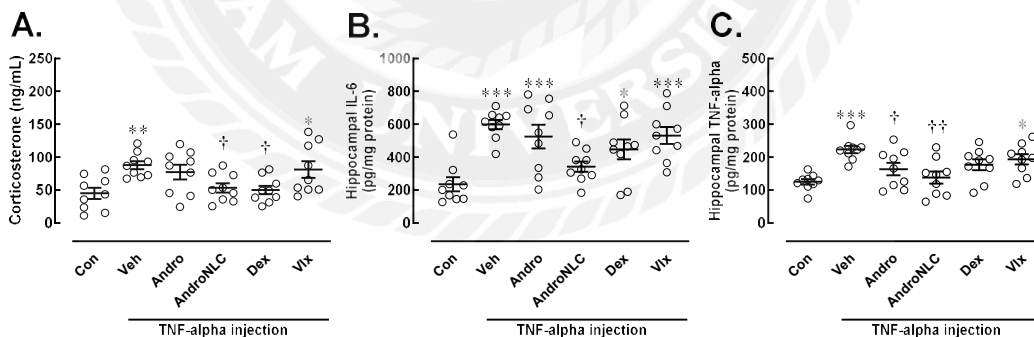


รูปที่ 4.7 ผลของสารลดการอึกเสบต่อการจดจำวัตถุใหม่

4.7 ผลสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชันต่อสารชีวเคมีบ่งชี้ความเครียดและการอักเสบในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

การเปลี่ยนแปลงทางสารชีวเคมีในเลือดด้วยชุดทดสอบฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน ผลการศึกษาพบว่า หนูที่ได้ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและได้รับยาปลอม (Veh) มีระดับฮอร์โมนความเครียดเพิ่มสูงขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุม ($p = 0.003$) สารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน (AndroNLC) สามารถลดระดับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนเช่นเดียวกับยาลดการอักเสบมาตรฐานเดกซามيثาโซน (Dex, $p = 0.014$) ฉะนั้นสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันมีประสิทธิภาพลดระดับฮอร์โมนความเครียดได้ดีกว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andro) ขณะที่ยาต้านความซึมเศร้าไม่สามารถลดปริมาณฮอร์โมนความเครียดจากการชักนำให้เกิดการอักเสบ (ดังแสดงในภาพที่ 4.8A)

ทั้งนี้ผลการศึกษาปริมาณสารอักเสบในเนื้อเยื่อสมอง พบว่า หนูเมาส์ที่ได้รับยาปลอม (Veh) มีระดับสารอักเสบในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ได้แก่ IL-6 ($p < 0.001$) และ TNF-alpha ($p = 0.001$) ตามลำดับ แม้ว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์ในรูปแบบธรรมชาติ (Andro) สามารถลดระดับสาร TNF-alpha ได้ แต่สาร AndroNLC มีประสิทธิภาพในการลดระดับสารชักนำการอักเสบทั้ง IL-6 ($p=0.013$) และ TNF-alpha ($p=0.01$) ได้ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับยาปลอม (Veh) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.8B-C)

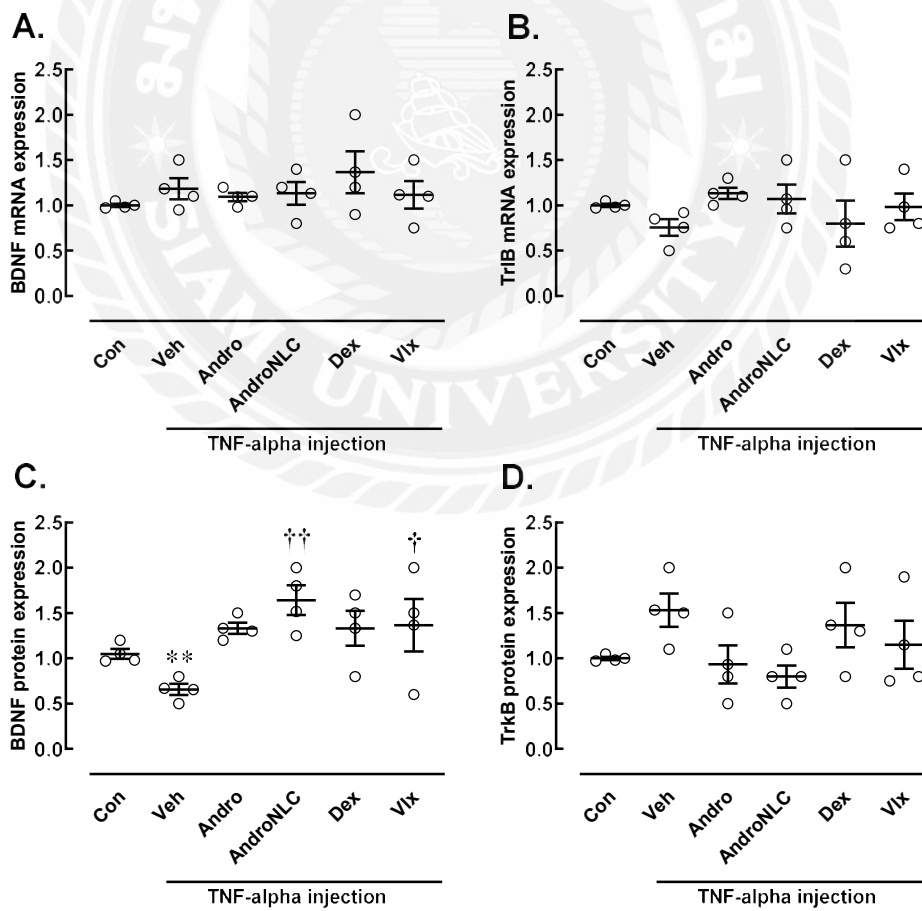


รูปที่ 4.8 ผลของสารลดการอักเสบต่อฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนและสารชักนำการอักเสบ

4.8 ผลสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิโปโซมนาโนอิมันชันต่อปริมาณอินและโปรตีนบ่งชี้ความยืดหยุ่นของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

แม้ว่าไม่พบความแตกต่างของปริมาณอินระหว่างกลุ่ม แต่ผลการแสดงออกของโปรตีน BDNF แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ โดยกลุ่มที่ได้รับยาปลอมมีปริมาณ โปรตีน BDNF ลดลง ($p=0.009$) ขณะที่สารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน (AndroNLC) และยาเวนลาฟาซีน (Vix) เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน BDNF เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาปลอมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.017$) ขณะที่ปริมาณ โปรตีน TrkB มีเปลี่ยนแปลงที่ไม่ชัดเจนมากนัก (ภาพที่ 4.9)

ผลการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน (AndroNLC) มีต่อการเพิ่มการแสดงออกของปัจจัยกระตุ้นการเจริญของเส้นประสาท โดยมีการเพิ่มปริมาณโปรตีน BDNF ซึ่งเป็นสารชีวเคมีในสมองบ่งชี้สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันหรือฟื้นฟูระบบประสาทจากการอักเสบ



ภาพที่ 4.9 ผลของสารลดการอักเสบการแสดงผลของปริมาณอิน/โปรตีนบ่งชี้ความยืดหยุ่นสมอง

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้พบว่า สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ถูกห่อหุ้มในลิโปโซมนาโนอิมัลชัน (AndroNLCs) มีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเล็กที่มีขนาดเฉลี่ย 131.40 ± 1.30 นาโนเมตร พร้อมค่า zeta potential ที่ -33.33 ± 1.03 มิลลิโวลต์ ซึ่งแสดงถึงความเสถียรของอนุภาคในน้ำ ประสิทธิภาพการห่อหุ้มของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในอนุภาค AndroNLCs อยู่ที่ $89.11 \pm 0.15\%$ โดยการทดลองทางเซลล์พบว่า สาร AndroNLCs มีความเป็นพิษต่อเซลล์ SH-SY5Y ต่ำกว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ไม่ได้ห่อหุ้ม และ สาร Blank nanoparticles ที่ความเข้มข้นต่างๆ นอกจากนี้ สาร AndroNLCs สามารถเข้าสู่เซลล์ประสาท SH-SY5Y ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการสะสมของอนุภาคเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการสัมผัสกับเซลล์ (exposure time) ซึ่งแสดงถึงศักยภาพของระบบนำส่งนาโนอิมัลชันในแง่ของการนำสารเข้าสู่เซลล์ได้อย่างดี

การศึกษานี้ในการทดลองสัตว์ พบว่าการรักษาด้วยสาร AndroNLCs ช่วยลดพฤติกรรมวิตกกังวลและความผิดปกติในการเคลื่อนไหวในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดการอักเสบในระบบประสาทเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า สาร AndroNLCs มีศักยภาพในการบรรเทาการอักเสบในระบบประสาทและส่งผลดีต่อพฤติกรรมวิตกกังวล ซึมเศร้า และความจำบกพร่องของหนูเม้าส์เพศผู้ ซึ่งประเมินด้วยเครื่องมือทดสอบพฤติกรรมทางประสาทวิทยาศาสตร์

ผลการศึกษาบ่งชี้ว่า สาร AndroNLCs มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการบรรเทาการอักเสบในระบบประสาท ทำให้มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้พัฒนาเป็นแนวทางการรักษาใหม่ๆ สำหรับภาวะการอักเสบในระบบประสาท

5.2. อภิปรายผล

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) ใน วงศ์ Acanthaceae เป็น สมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงประเทศไทย ฟ้าทะลายโจรมีสรรพคุณหลายประการ เช่น บรรเทาอาการไข้หวัด ลดการอักเสบ และต้านการติดเชื้อ (Hossain et al., 2014) สารออกฤทธิ์หลักในฟ้าทะลายโจร คือ แอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide, Andro) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Li et al., 2022; Messire et al., 2023) อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการลดการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งสารที่ชักนำการอักเสบในเซลล์ประสาทเพะเลียง (Tzeng et al., 2012)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของแอนโดรกราโฟไลด์ในด้านลดการอักเสบเชิงระบบและการรักษาในสัตว์ทดลองหรือมนุษย์ยังคงค่อนข้างจำกัด อีกทั้งแอนโดรกราโฟไลด์ (Andro) ยังละลายน้ำได้ยากและไม่เสถียรในสภาพแวดล้อมทั่วไป ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพทางเภสัชวิทยาลดลง (Loureiro Damasceno et al., 2022) การศึกษานี้จึงทำการพัฒนาระบบนำส่งสารลิโปโซมนาโนอิมันชัน (NLCs) ซึ่งเป็นแนวทางใหม่ในการเพิ่มการดูดซึมและเสถียรภาพของสาร Andro ที่ช่วยปกป้องการย่อยสลายในสภาพแวดล้อมภายนอกแล้ว ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งสารสำคัญไปยังบริเวณที่มีการอักเสบและเสริมฤทธิ์การลดการอักเสบในเนื้อเยื่อได้มากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ ความปลอดภัย ความสามารถในการนำสู่เซลล์ และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร AndroNLCs ในการบรรเทาพฤติกรรมผิดปกติและการเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีที่ตอบสนองต่อการอักเสบในสัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดการอักเสบเชิงระบบ ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถอภิปรายผลได้ดังนี้

5.2.1 การพัฒนาระบบขนส่งสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน

ผลการศึกษาการพัฒนาระบบขนส่งสารแอนโดรกราโฟไลด์ด้วยการบรรจุลงในอนุภาคนาโนไขมัน (AndroNLCs) มีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเฉลี่ย 131.40 ± 1.30 นาโนเมตร พร้อมค่า zeta potential ที่ -33.33 ± 1.03 มิลลิโวลต์ ซึ่งบ่งบอกถึงความเสถียรสูงในน้ำ (Németh et al., 2022) ทั้งนี้มีความสามารถในการห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ใน NLCs มีประสิทธิภาพสูงที่ $89.11 \pm 0.15\%$ ทำให้สารออกฤทธิ์มีความเสถียรและปล่อยสารออกฤทธิ์ได้อย่างคงที่ (Mainuddin et al., 2024) จากคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสาร AndroNLCs ทำให้มีความสามารถในการเจาะทะลุเซลล์และส่งสารสำคัญที่ช่วยออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น ซึ่งอาจมีความเสถียรของค่า pH และความเป็นกรด-ด่างที่คงที่ และทำให้มีแตกต่างจากสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ไม่ได้ห่อหุ้มที่อาจมีปัญหาเรื่องความเสถียรและการปล่อยสารออกฤทธิ์ที่ไม่คงที่ (Khan et al., 2023) ฉะนั้นการศึกษานี้ช่วยแสดงให้เห็นว่า สาร AndroNLCs มีคุณสมบัติที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่ไม่ได้ห่อหุ้มด้วย NLC

ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงทำให้ทราบว่า สาร AndroNLCs มีระดับความเป็นพิษต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ไม่ได้ห่อหุ้ม (Andro) และสาร Blank nanoparticles ซึ่งผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า วิธีการห่อหุ้มด้วย NLC ช่วยลดความเป็นพิษและเพิ่มความปลอดภัยในการนำใช้รักษา (Khan et al., 2023; Mahor et al., 2023)

จากที่กล่าวมาในข้างต้น สาร AndroNLCs ได้รับการปรับปรุงความสามารถในการละลายน้ำของสารแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งเดิมละลายน้ำได้ยาก ส่งผลให้การดูดซึมของสารเข้าสู่กระแสเลือดและการนำส่งสารไปยังเป้าหมายเฉพาะมากยิ่งขึ้น การนำแอนโดรกราโฟไลด์เข้าสู่ระบบอนุภาคนาโนไขมันช่วยป้องกันสารจากการเสื่อมสภาพเมื่อสัมผัสกับสภาพแวดล้อมที่ไม่เสถียร เช่น การสัมผัสกับน้ำและแสง หรือ ภาวะกรด-ด่าง ทำให้การนำส่งสารในร่างกายยาวนานขึ้นและลดปริมาณสารที่สูญเสียก่อนถึงเป้าหมาย (Huang et al., 2024) นอกจากนี้ ยังมีความเป็นไปได้ที่ สาร AndroNLCs สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์กั้นเนื้อเยื่อสมองระบบประสาทส่วนกลาง (BBB) ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถเพิ่มโอกาสให้เกิดการนำส่งสารไปใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในสมองได้ (Zwain et al., 2021) เช่นเดียวกันกับสารขนส่งสารเคอร์คูมินจากขมิ้นชันหรือสารแคนนาบินอยด์จากกัญชาทำให้ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากขึ้น (Won et al., 2023; Lapmanee et al., 2024)

5.2.2 ประสิทธิภาพของสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันต่อการอักเสบ

ผลจากการปรับปรุงการดูดซึมและความสามารถในการออกฤทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ด้วยการห่อหุ้มสารลิโปโซมนาโนอิมันชัน ตัวนำส่งลิโปโซมนาโนอิมันชันช่วยเพิ่มการดูดซึมของสำคัญนี้ผ่านเยื่อบุทางเดินอาหาร ทำให้สารสำคัญสามารถเข้าสู่กระแสเลือดได้ดีขึ้นและมีความเข้มข้นที่สูงขึ้นในช่วงเวลานานขึ้น (Mahor et al., 2023) ผลจากการทดลองในสัตว์พบว่า สาร AndroNLCs สามารถลดการอักเสบในเลือดและในระดับเนื้อเยื่อสมองได้ดีกว่าการใช้แอนโดรกราโฟไลด์ในรูปแบบปกติ การที่สาร AndroNLCs สามารถลดระดับอักเสบไซโตไคน์ ได้แก่ IL-6 และ TNF-alpha บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพในการลดกระบวนการอักเสบในร่างกายได้

กลไกสำคัญที่ทำให้สาร AndroNLCs มีประสิทธิภาพสูงขึ้น อาจเกิดจากการห่อหุ้มสารสำคัญในอนุภาคนาโนไขมันที่ช่วยนำส่งสารเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้อย่างตรงจุด รวมถึงการปลดปล่อยสารสำคัญอย่างช้าๆ ในระยะเวลาที่ยาวนาน ทำให้สารออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Li et al., 2017; Khan et al., 2023) นอกจากนี้การที่สาร AndroNLCs สามารถเข้าสู่เซลล์ประสาท SH-SY5Y เพาะเลี้ยงและแสดงผลการสะสมในเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้วนั้น ยังแสดงถึงศักยภาพของระบบการนำส่งที่ช่วยให้สารแอนโดรกราโฟไลด์สามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่ไม่ได้ห่อหุ้มในนาโนอิมัลชัน (Bittner et al., 2021; Balyasnikova et al., 2022) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งพบว่า NLC สามารถช่วยเพิ่มการดูดซึมและการส่งผ่านสารที่ยากต่อการซึมผ่านในสมองได้ ดังนั้นสาร AndroNLCs จึงมีความสามารถในการทะลุผ่าน BBB ซึ่งเป็นกุญแจสำคัญสำหรับการรักษาโรคทางสมอง (Zwain et al., 2021)

ยิ่งไปกว่านั้นสาร AndroNLCs มีศักยภาพสูงในการบรรเทาอาการอักเสบในระบบประสาท และการบรรเทาความผิดปกติทางพฤติกรรมในสัตว์ทดลองได้เทียบเคียงกับยาลดการอักเสบ โดยกลไกที่เป็นไปได้ของสาร AndroNLCs นั้นอาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนโดรกราโฟไลด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ สาร AndroNLCs สามารถยับยั้งการหลั่งของไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น TNF-alpha, IL-1 β และ IL-6 การลดลงของไซโตไคน์เหล่านี้ก็นำไปสู่การลดการอักเสบในเซลล์ประสาทและในระบบประสาทส่วนกลาง (Li et al., 2022; Bosco et al., 2023) นอกจากนี้ แอนโดรกราโฟไลด์ยังได้รับการยืนยันว่ามีฤทธิ์ป้องกันความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญในการเกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาทและโรคทางสมองอื่นๆ (Zhou et al., 2022; Phetruen et al., 2023)

เป็นที่ทราบกันว่า ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอนโดรกราโฟไลด์เกิดจากการยับยั้งการทำงานของโปรตีนกลุ่ม nuclear factor-kappa B (NF- κ B) และการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบ (Bosco et al., 2023; Chang et al., 2024) โดยจากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สาร AndroNLCs ช่วยลดการหลั่งของไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบ ทำให้มีโอกาที่จะใช้เป็นแนวทางการรักษาในโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของสมอง เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's Disease), พาร์กินสัน (Parkinson's Disease) และภาวะซึมเศร้าที่มีปัจจัยเกี่ยวข้องกับการอักเสบในสมอง ซึ่งมีผลต่อปริมาณฮิปโปแคมปัส BDNF ที่ช่วยฟื้นฟูระบบประสาทจากการอักเสบ ดังแสดงผลการศึกษาการแสดงผลออกของโปรตีน BDNF ในกลุ่มที่รักษาด้วยสาร AndroNLCs มีปริมาณเพิ่มขึ้นเทียบเท่ากับกลุ่มที่ได้รับปรับการทำงานของสารสื่อประสาทในสมองที่ช่วยลดความซึมเศร้าในหนูทดลอง ซึ่งสาร AndroNLCs ลดปริมาณสารกลุ่มอักเสบ ได้แก่ NO, COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6 และ TNF- α การส่งสัญญาณ NF- κ B (p-p65, p-I κ B α) และอินฟลัมโมโซม NLRP3 (NLRP3, ASC และ caspase-1) (Geng et al., 2019; Zhang et al., 2019) ได้อีกด้วย รวมถึงการยับยั้งการผลิต pro-inflammatory cytokines ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองต่อการอักเสบในสมอง และช่วยยับยั้งการทำงานของ NF- κ B pathway ที่เป็นสาเหตุหลักของการอักเสบในเซลล์ประสาทแอนโดรกราโฟไลด์สามารถส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ไมโครเกลีย (microglia) ซึ่งเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันในสมอง ช่วยลดการกระตุ้นของไมโครเกลียในระยะยาว ซึ่งส่งผลต่อการลดการอักเสบและการเสื่อมของระบบประสาทในระยะยาว (Lu et al., 2019; Bosco et al., 2023)

5.2.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันและการอักเสบมาตรฐาน

การวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพสารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชันกับยาต้านการอักเสบเดกซามิทาโซน (dexamethasone, Dex) ขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และยาต้านการดูดกลับเซโรโตนินและนอร์อิพิเนฟริน เวนลาฟาซีน (venlafaxine, Vlx) ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว นำมาศึกษาในสัตว์ทดลอง เนื่องด้วยประสิทธิภาพการลดการอักเสบเชิงระบบและป้องกันการอักเสบของสมอง

ยาเดกซามิทาโซน (Dex) เป็นยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ที่ใช้ในการลดการอักเสบอย่างรุนแรงในระบบต่างๆ ของร่างกาย รวมถึงสมอง อย่างไรก็ตาม DEX มีผลข้างเคียงที่สำคัญ เช่น การกดภูมิคุ้มกัน การสูญเสียมวลกระดูก และความเสี่ยงต่อการเกิดโรคทางเมตาบอลิซึม (Dubashynskaya et al., 2021) ขณะที่ยาเวนลาฟาซีน (Vlx) เป็นยาต้านอาการซึมเศร้าในกลุ่ม serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) ซึ่งใช้รักษาความผิดปกติทางอารมณ์และมีบทบาทในการลดการอักเสบในระบบประสาทจากการปรับการทำงานและปริมาณของสารสื่อประสาทกลุ่มโมโนเอมีน ผลการศึกษาที่ผ่านมาระบุว่า ยา Vlx สามารถปรับปรุงระดับสารสื่อประสาทเช่น serotonin และ norepinephrine ซึ่งช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของระบบประสาท (Wigner et al., 2020; Lapmanee et al., 2024) จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ผลการศึกษา พบว่า สาร AndroNLCs มีประสิทธิภาพในการลดการอักเสบได้ใกล้เคียงกับ DEX แต่มีข้อได้เปรียบสำคัญ คือ สาร AndroNLCs การไม่กดภูมิคุ้มกันและมีความเสี่ยงต่อผลข้างเคียงระยะยาวน้อยกว่า ทั้งนี้ระบบนำส่ง NLCs ช่วยเพิ่มความจำเพาะในการออกฤทธิ์ของแอนโดรกราโฟไลด์ที่เป้าหมายในสมองและมีแนวโน้มที่จะผ่านเซลล์กั้นเนื้อเยื่อสมอง BBB ได้ดีกว่ายา Dex ซึ่งอาจทำให้การรักษามีประสิทธิภาพและปลอดภัยมากยิ่งขึ้น (Koga et al., 2016; Zhu et al., 2021; Nog et al., 2024)

นอกจากนี้ตัวนำพาสาร NLCs ทำให้แอนโดรกราโฟไลด์มีความสามารถในการส่งผ่านเข้าสู่สมองผ่าน BBB ซึ่งช่วยเพิ่มการเข้าถึงของยาสู่บริเวณสมองที่ต้องการรักษา ความสามารถนี้อาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสมดุลการทำงานวงจรประสาทในสมองที่ถูกควบคุมโดย BBB และการเปลี่ยนแปลงการทำงานของโปรตีนขนส่งในสมอง ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการนำสารเข้าสู่สมอง (Zha et al., 2024)

ยิ่งไปกว่านั้น มีความเป็นไปได้ว่า สาร AndroNLCs อาจมีส่วนช่วยในการปรับสมดุลของระบบประสาทและลำไส้ ซึ่งมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองต่อการอักเสบ เนื่องจากการอักเสบในลำไส้มีผลต่อสมองและพฤติกรรมโดยตรงผ่านการสื่อสารของ

เส้นประสาท vagus nerve และการปล่อยสารก่อการอักเสบจากลำไส้ (Han et al., 2022; Kasarello et al., 2023) อย่างไรก็ตามการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตควรมุ่งเน้นกลไกในการผ่านเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง และการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบในสมองอย่างแน่ชัด

ผลจากการเผชิญกับภาวะอักเสบเชิงระบบและชักนำไปให้เกิดการอักเสบของระบบประสาท และนำไปสู่การแสดงออกของพฤติกรรมที่ผิดปกติ ได้แก่ ความวิตกกังวล ซึมเศร้า และการเรียนรู้บกพร่อง ทำให้หนูที่ได้รับยาปลอมมีระดับความวิตกกังวล ซึมเศร้า และไม่สามารถแยกแยะและจดจำวัตถุใหม่ได้ (Morimoto et al., 2023; Tan et al., 2013) ในขณะที่สารแอนโดรกราโฟไลด์ในลิโปโซมนาโนอิมันชัน AndroNLCs สามารถบรรเทาภาวะการอักเสบของร่างกาย จึงสามารถฟื้นฟูความผิดปกติของพฤติกรรมประสาทในหนูเพศผู้ที่ได้ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบได้เทียบเคียงกับยาปรับการทำงานของสารสื่อประสาท Vlx และยาลดการอักเสบมาตรฐาน Dex (Yuan et al., 2022) ฉะนั้นยาเวเนลาฟาซิน (Vlx) สามารถบรรเทาการอักเสบของสมองได้โดยตรงเทียบเท่ากับยาเดกซาเมทาโซน Dex (Zhang et al., 2019; Espinosa et al., 2020; Yuan et al., 2022; Soltani et al., 2023)

แม้ว่าสาร AndroNLCs จะไม่แสดงผลโดยตรงในการปรับระดับสารสื่อประสาท เช่นเดียวกับ VIX แต่การออกฤทธิ์ด้านการอักเสบที่สูงของแอนโดรกราโฟไลด์ผ่านระบบ NLCs ช่วยลดการอักเสบในระบบประสาทได้อย่างมีประสิทธิภาพ ฉะนั้นการใช้สาร AndroNLCs ร่วมกับยา Vlx หรือใช้เป็นแนวทางทางเลือกในอนาคตสามารถช่วยลดผลกระทบของการอักเสบต่ออารมณ์และพฤติกรรมได้ดี

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับโมเลกุลเพื่อระบุกลไกการทำงานที่แน่นอนของสาร AndroNLCs ในการลดการอักเสบในระบบประสาท และบทบาทของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อการอักเสบ รวมทั้งการศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกการผ่าน BBB ในการระบุความสามารถของการส่งยาไปยังสมองได้อย่างแม่นยำ

5.3.2 การทดสอบการใช้สาร AndroNLCs ร่วมกับยา Vlx หรือ Dex เพื่อประเมินผลของการใช้ร่วมกันในเชิงการเสริมฤทธิ์และการลดผลข้างเคียง และการศึกษาในรูปแบบระยะยาว (long-term studies) รวมทั้ง acute และ chronic toxicity เพื่อประเมินความปลอดภัยและประสิทธิภาพของการใช้สาร AndroNLCs

5.3.3 การศึกษาทางคลินิกเพื่อยืนยันประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสาร AndroNLCs โดยเฉพาะในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของสมอง

บรรณานุกรม

- Adiguna S.P., Panggabean J.A., Atikana A., Untari F., Izzati F., Bayu A., Rosyidah A., Rahmawati S.I., & Putra M.Y. (2021). Antiviral activities of andrographolide and its derivatives: mechanism of action and delivery system. *Pharmaceuticals*, 14(11):1102.
- Balyasnikova I.V., Zannikou M., Wang G., Li Y., Duffy J.T., Levine R.N., Seblani M., Gaikwad H., & Simberg D. (2022). Indocarbocyanine nanoparticles extravasate and distribute better than liposomes in brain tumors. *Journal of Controlled Release*, 349:413-424.
- Bauer M.E., & Teixeira A.L. (2021). Neuroinflammation in mood disorders: role of regulatory immune cells. *Neuroimmunomodulation*, 2021;28(3):99-107.
- Bhubhanil S., Talodthaisong C., Khongkow M., Namdee K., Wongchitrat P., Yingmema W., Hutchison J.A., Lapmanee S., & Kulchat S. (2021). Enhanced wound healing properties of guar gum/curcumin-stabilized silver nanoparticle hydrogels. *Scientific Reports*, 11(1):21836.
- Biesmans S., Bouwknecht J.A., Ver Donck L., Langlois X., Acton P.D., De Haes P., Davoodi N., Meert T.F., Hellings N., & Nuydens R. (2015). Peripheral administration of tumor necrosis factor-alpha induces neuroinflammation and sickness but not depressive-like behavior in mice. *BioMed Research International*. 716920.
- Bilia A.R., Piazzini V., Guccione C., Risaliti L., Asprea M., Capecchi G., & Bergonzi M.C. (2017). Improving on nature: the role of nanomedicine in the development of clinical natural drugs. *Planta Medica*, 83(5):366-381.
- Bittner A., Gosselet F., Sevin E., Dehouck L., Ducray A.D., Gaschen V., Stoffel M.H., Cho H., & Mevissen M. (2021). Time-dependent internalization of polymer-coated silica nanoparticles in brain endothelial cells and morphological and functional effects on the blood-brain barrier. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4):1657.
- Bosco F., Ruga S., Citraro R., Leo A., Guarnieri L., Maiuolo J., Oppedisano F., Macri R., Scarano F., Nucera S., Bava I., Palma E., Muscoli C., Hancke J., De Sarro G., & Mollace V. (2023). The effects of *Andrographis paniculata* (Burm.F.) Wall. Ex Nees and andrographolide on neuroinflammation in the treatment of neurodegenerative diseases. *Nutrients*, 15(15):3428.

- Casamonti M., Risaliti L., Vanti G., Piazzini V., Bergonzi M.C., & Bilia A.R. (2019). Andrographolide loaded in micro- and nano-formulations: improved bioavailability, target-tissue distribution, and efficacy of the “King of Bitters”. *Engineering*, 5:69–75.
- Chang C.C., Duann Y.F., Yen T.L., Chen Y.Y., Jayakumar T., Ong E.T., & Sheu J.R. (2014). Andrographolide, a novel NF- κ B inhibitor, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and cerebral endothelial cell inflammation. *Acta Cardiologica Sinica*, 30(4):308-315.
- Conrad K.L., & Winder D.G. (2011). Altered anxiety-like behavior and long-term potentiation in the bed nucleus of the stria terminalis in adult mice exposed to chronic social isolation, unpredictable stress, and ethanol beginning in adolescence. *Alcohol*, 45(6):585-593.
- Coutens B., Yrondi A., Rampon C., & Guiard B.P. (2022). Psychopharmacological properties and therapeutic profile of the antidepressant venlafaxine. *Psychopharmacology*, 239(9):2735-2752.
- Dai Y., Chen S.R., Chai L., Zhao J., Wang Y., & Wang Y. (2019). Overview of pharmacological activities of *Andrographis paniculata* and its major compound andrographolide. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(sup1):S17–29.
- Dell'Osso B., Palazzo M.C., Oldani L., & Altamura A.C. (2011). The noradrenergic action in antidepressant treatments: pharmacological and clinical aspects. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 17(6):723-732.
- Dong Z., Han H., Li H., Bai Y., Wang W., Tu M., Peng Y., Zhou L., He W., Wu X., Tan T., Liu M., Wu X., Zhou W., Jin W., Zhang S., Sacktor T.C., Li T., Song W., & Wang Y.T. (2015). Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. *Journal of Clinical Investigation*, 125(1):234-47.
- Dubashynskaya N.V., Bokaty A.N., & Skorik Y.A. (2021). Dexamethasone conjugates: synthetic approaches and medical prospects. *Biomedicines*. 2021;9(4):341.
- Espinosa A., Meneses G., Chavarría A., Mancilla R., Pedraza-Chaverri J., Fleury A., Bárcena B., Pérez-Osorio I.N., Besedovsky H., Arauz A., Fragoso G., & Scitutto E. (2020). Intranasal dexamethasone reduces mortality and brain damage in a mouse experimental ischemic stroke model. *Neurotherapeutics*, 17(4):1907-1918.

- Fathy S.M., El-Dash H.A., & Said N.I. (2021). Neuroprotective effects of pomegranate (*Punica granatum L.*) juice and seed extract in paraquat-induced mouse model of Parkinson's disease. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1):130.
- Geng J., Liu J., Yuan X., Liu W., & Guo W. (2019). Andrographolide triggers autophagy-mediated inflammation inhibition and attenuates chronic unpredictable mild stress (CUMS)-induced depressive-like behavior in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 379:114688.
- Glasgow S.D., Ruthazer E.S., & Kennedy T.E. (2020). Guiding synaptic plasticity: novel roles for netrin-1 in synaptic plasticity and memory formation in the adult brain. *The Journal of Physiology*, 3.
- Gu X.H., Li H., Zhang L., He T., Chai X., Wei H., & Gao D.S. (2020). Differential expression of glial cell line-derived neurotrophic factor splice variants in the mouse brain. *Neural Regeneration Research*, 15(2):270-276.
- Hajhashemi V., Minaiyan M., Banafshe H.R., Mesdaghinia A., & Abed A. (2015). The anti-inflammatory effects of venlafaxine in the rat model of carrageenan-induced paw edema. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(7):654-658.
- Han Y., Wang B., Gao H., He C., Hua R., Liang C., Zhang S., Wang Y., Xin S., & Xu J. (2022). Vagus nerve and underlying impact on the gut microbiota-brain axis in behavior and neurodegenerative diseases. *Journal of Inflammation Research*, 15:6213-6230.
- Hu X.Y., Wu R.H., Logue M., Blondel C., Lai L.Y.W., Stuart B., Flower A., Fei Y.T., Moore M., Shepherd J., Liu J.P., & Lewith G. (2017). *Andrographis paniculata* (Chuān Xīn Lián) for symptomatic relief of acute respiratory tract infections in adults and children: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 12(8):e0181780.
- Huang L., Huang X.H., Yang X., Hu J.Q., Zhu Y.Z., Yan P.Y., & Xie Y. (2024). Novel nano-drug delivery system for natural products and their application. *Pharmacological Research*, 107100.
- Jia Z., Wang X., Wei X., Zhao G., Foster K.W., Qiu F., Gao Y., Yuan F., Yu F., Thiele G.M., Bronich T.K., O'Dell J.R., & Wang D. (2018). Micelle-forming dexamethasone prodrug attenuates nephritis in lupus-prone mice without apparent glucocorticoid side effects. *ACS Nano*, 12(8):7663-7681.

- Johnson D.B., Lopez M.J., & Kelley B. Dexamethasone. [Updated 2023 May 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 January. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482130/>.
- Jung Y.J., Tweedie D., Scerba M.T., & Greig N.H. (2019). Neuroinflammation as a factor of neurodegenerative disease: thalidomide analogs as treatments. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7:313.
- Kasarello K., Cudnoch-Jedrzejewska A., & Czarzasta K. (2023). Communication of gut microbiota and brain via immune and neuroendocrine signaling. *Frontiers in Microbiology*, 14:1118529.
- Khan S., Sharma A., & Jain V. (2023). An overview of nanostructured lipid carriers and its application in drug delivery through different routes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 13(3):446-460.
- Koga J., Matoba T., & Egashira K. (2016). Anti-inflammatory nanoparticle for prevention of atherosclerotic vascular diseases. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 23(7):757-765.
- Kucharava K., Brand Y., Albano G., Sekulic-Jablanovic M., Glutz A., Xian X., Herz J., Bodmer D., Fuster D.G., & Petkovic V. (2020). Sodium-hydrogen exchanger 6 (NHE6) deficiency leads to hearing loss, via reduced endosomal signalling through the BDNF/Trk pathway. *Scientific Reports*, 10(1):3609.
- Lapmanee S., Bhubhanil S., Sriwong S., Khongkow M., Namdee K., Wongchitrat P., & Pongkorpsakol P. (2022). Venlafaxine and synbiotic attenuate learned fear-like behavior and recognition memory impairment in immobilized-stressed rats. *Physiology and Pharmacology*, 27 (2) :171-181.
- Lapmanee S., Bhubhanil S., Sriwong S., Yuajit C., Wongchitrat P., Teerapornpantakit J., Suntornsaratoon P., Charoenphandhu J., & Charoenphandhu N. (2023). Oral calcium and vitamin D supplements differentially alter exploratory, anxiety-like behaviors and memory in male rats. *PLoS One*, 18(8):e0290106.
- Lapmanee S., Bhubhanil S., Wongchitrat P., Charoenphon N., Inchan A., Ngernsutivorakul T., Dechbumroong P., Khongkow M., & Namdee K. (2024). Assessing the safety and therapeutic efficacy of cannabidiol lipid nanoparticles in alleviating metabolic and memory

- impairments and hippocampal histopathological changes in diabetic Parkinson's rats. *Pharmaceutics*, 16(4):514.
- Lapmanee S., Charoenphandhu J., & Charoenphandhu N. (2013). Beneficial effects of fluoxetine, reboxetine, venlafaxine, and voluntary running exercise in stressed male rats with anxiety- and depression-like behaviors. *Behavioural Brain Research*, 250:316-25.
- Lapmanee S., Charoenphandhu J., Teerapornpantakit J., Krishnamra N., & Charoenphandhu N. (2017). Agomelatine, venlafaxine, and running exercise effectively prevent anxiety- and depression-like behaviors and memory impairment in restraint stressed rats. *PLoS One*, 12(11):e0187671.
- Lapmanee S., Charoenphandhu N., Krishnamra N., & Charoenphandhu J. (2012). Anxiolytic-like actions of reboxetine, venlafaxine and endurance swimming in stressed male rats. *Behavioural Brain Research*, 231(1):20-8.
- Lapmanee S., Supkamonseni N., Bhubhanil S., Treesaksrisakul N., Sirithanakorn C., Khongkow M., Namdee K., Surinlert P., Tipbunjong C., & Wongchitrat P. (2024). Stress-induced changes in cognitive function and intestinal barrier integrity can be ameliorated by venlafaxine and synbiotic supplementations. *PeerJ*, 12:e17033.
- Li J., Zhang L., Xu C., Lin Y.H., Zhang Y., Wu H.Y., Chang L., Zhang Y.D., Luo C.X., Li F., & Zhu D.Y. (2020). Prolonged use of NMDAR antagonist develops analgesic tolerance in neuropathic pain via nitric oxide reduction-induced GABAergic disinhibition. *Neurotherapeutics*, 17(3):1016-1030.
- Li Q., Cai T., Huang Y., Xia X., Cole S.P.C., & Cai Y. (2017). A review of the structure, preparation, and application of NLCs, PNPs, and PLNs. *Nanomaterials*, 7(6):122.
- Li X., Yuan W., Wu J., Zhen J., Sun Q., & Yu M. (2022). Andrographolide, a natural anti-inflammatory agent: an update. *Frontiers in Pharmacology*, 13:920435.
- Li X., Zhu L., Su Y., & Fang S. (2017). Short-term efficacy and tolerability of venlafaxine extended release in adults with generalized anxiety disorder without depression: a meta-analysis. *PLoS One*, 12(10):e0185865.
- Li Y., He S., Tang J., Ding N., Chu X., Cheng L., Ding X., Liang T., Feng S., Rahman S.U., Wang X., & Wu J. (2017). Andrographolide inhibits inflammatory cytokines secretion in

- LPS-stimulated RAW264.7 cells through suppression of NF- κ B/MAPK signaling pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017:8248142.
- Li. Y.Z., Wu Z.Y., Zhu B.Q., Wang Y.X., Kan Y.Q., & Zeng H.C. (2022). The BDNF-TrkB-CREB signalling pathway is involved in bisphenols-induced neurotoxicity in male mice by regulating methylation. *Toxics*, 10(8):413.
- Liu J., Likhtik E., Shereen A.D., Dennis-Tiwary T.A., & Casaccia P. (2020). White matter plasticity in anxiety: disruption of neural network synchronization during threat-safety discrimination. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14:587053.
- Liu W., Ge T., Leng Y., Pan Z., Fan J., Yang W., & Cui R. (2017). The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex. *Neural Plasticity*, 2017:6871089.
- Liu Y., Zhao J., & Guo W. (2018). Emotional roles of mono-aminergic neurotransmitters in major depressive disorder and anxiety disorders. *Frontiers in Psychology*, 9:2201.
- Loureiro Damasceno J.P., Silva da Rosa H., Silva de Araújo L., & Jacometti Cardoso Furtado N.A. (2022). *Andrographis paniculata* formulations: impact on diterpene lactone oral bioavailability. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 47(1):19-30.
- Lu J., Ma Y., Wu J., Huang H., Wang X., Chen Z., Chen J., He H., & Huang C. (2019). A review for the neuroprotective effects of andrographolide in the central nervous system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117:109078.
- Lucassen P.J., Oomen C.A., Naninck E.F., Fitzsimons C.P., van Dam A.M., Czeh B., & Korosi A. (2015). Regulation of adult neurogenesis and plasticity by (early) stress, glucocorticoids, and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9):a021303.
- Mahnashi M.H., Jabbar Z., Alamgeer, Irfan H.M., Asim M.H., Akram M., Saif A., Alshahrani M.A., Alshehri M.A., & Asiri S.A. (2021). Venlafaxine demonstrated anti-arthritis activity possibly through down regulation of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and COX-2. *Inflammopharmacology*, 29(5):1413-1425.
- Mahor A.K., Singh P.P., Gupta R., Bhardwaj P., Rathore P., Kishore A., Goyal R., Sharma N., Verma J., Rosenholm J.M., & Bansal K.K. (2023). Nanostructured lipid carriers for

- improved delivery of therapeutics via the oral route. *Journal of Nanotechnology*, 2023(1):4687959.
- Mainuddin, Kumar A., Ratnesh R.K., Singh J., Dumoga S., Sharma N., & Jindal A. (2024). Physical characterization and bioavailability assessment of 5-fluorouracil-based nanostructured lipid carrier (NLC): in vitro drug release, hemolysis, and permeability modulation. *Medical Oncology*, 41(5):95.
- Mkam Tsengam I.K., Omarova M., Kelley E.G., McCormick A., Bothun G.D., Raghavan S.R., & John V.T. (2022). Transformation of lipid vesicles into micelles by adding nonionic surfactants: elucidating the structural pathway and the intermediate structures. *The Journal of Physical Chemistry B*, 126(11):2208-2216.
- Morgese M.G., & Trabace L. (2019). Monoaminergic system modulation in depression and Alzheimer's disease: a new standpoint?. *Frontiers in Pharmacology*, 10:483.
- Morimoto K., Watanuki S., Eguchi R., Kitano T., & Otsuguro K.I. (2023). Short-term memory impairment following recovery from systemic inflammation induced by lipopolysaccharide in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 17:1273039.
- Mussard E., Cesaro A., Lespessailles E., Legrain B., Berteina-Raboin S., & Toumi H. (2019). Andrographolide, a Natural Antioxidant: An Update. *Antioxidants*, 8(12):571.
- Németh Z., Csóka I., Semnani Jazani R., Sipos B., Haspel H., Kozma G., Kónya Z., & Dobó D.G. (2022). Quality by design-driven zeta potential optimisation study of liposomes with charge imparting membrane additives. *Pharmaceutics*, 14(9):1798.
- Neves G, Cooke SF, & Bliss TV. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1):65-75.
- Nong J., Glassman P.M., Reyes-Esteves S., Descamps H.C., Shuvaev V.V., Kiseleva R.Y., Papp T.E., Alameh M.G., Tam Y.K., Mui B.L., Omo-Lamai S., Zamora M.E., Shuvaeva T., Arguiri E., Thaiss C.A., Myerson J.W., Weissman D., Kasner S.E., Parhiz H., Muzykantov V.R., Brenner J.S., & Marcos-Contreras O.A. (2024). Targeting lipid nanoparticles to the blood-brain barrier to ameliorate acute ischemic stroke. *Molecular Therapy*, 32(5):1344-1358.

- Noreen S., Maqbool I., & Madni A. (2021). Dexamethasone: therapeutic potential, risks, and future projection during COVID-19 pandemic. *European Journal of Pharmacology*, 894:173854.
- Panda D., Saha P., Das T., & Dash J. (2017). Target guided synthesis using DNA nano-templates for selectively assembling a G-quadruplex binding c-MYC inhibitor. *Nature Communications*, 8:16103.
- Panossian A., Hovhannisyan A., Mamikonyan G., Abrahamian H., Hambardzumyan E., Gabrielian E., Goukasova G., Wikman G., & Wagner H. (2000). Pharmacokinetic and oral bioavailability of andrographolide from *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in rats and human. *Phytomedicine*, 7(5):351-364.
- Park S.C., & Kim Y.K. (2019). An integrated bio-psycho-social approach to psychiatric disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1192:331-340.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition, Academic Press, San Diego.
- Phetruen T., van Dam B., & Chanarat S. (2023). Andrographolide induces ROS-mediated cytotoxicity, lipid peroxidation, and compromised cell integrity in *saccharomyces cerevisiae*. *Antioxidants*, 12(9):1765.
- Popova N.K., Ilchibaeva T.V., & Naumenko V.S. (2017). Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain. *Biochemistry*. 2017;82(3):308-317.
- Sharbafchi M.R., Afshar H., Adhamian P., Feizi A., Daghighzadeh H., & Adibi P. (2020). Effects of venlafaxine on gastrointestinal symptoms, depression, anxiety, stress, and quality of life in patients with the moderate-to-severe irritable bowel syndrome. *Journal of Research in Medical Sciences*, 25:115
- Slavich G.M., & Irwin M.R. (2014). From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychological Bulletin*, 140(3):774-815.
- Soltani A., Chugaeva U.Y., Ramadan M.F., Saleh E.A.M., Al-Hasnawi S.S., Romero-Parra R.M., Alsaalamy A., Mustafa Y.F., Zamanian M.Y., & Golmohammadi M. (2023). A narrative review of the effects of dexamethasone on traumatic brain injury in clinical and animal studies: focusing on inflammation. *Inflammopharmacology*, 31(6):2955-2971.

- Sugama S., Takenouchi T., Hashimoto M., Ohata H., Takenaka Y., & Kakinuma Y. (2019). Stress-induced microglial activation occurs through beta-adrenergic receptor: noradrenaline as a key neurotransmitter in microglial activation. *Journal of Neuroinflammation*, 16:266.
- Tan S., Chen W., Kong G., Wei L., & Xie Y. (2023). Peripheral inflammation and neurocognitive impairment: correlations, underlying mechanisms, and therapeutic implications. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15:1305790.
- Tang W., Zhao Y., Zhang H., Peng Y., & Rui Z. (2022). METTL3 enhances NSD2 mRNA stability to reduce renal impairment and interstitial fibrosis in mice with diabetic nephropathy. *BMC Nephrology*, 23(1):124.
- Thakur, A.K., Chatterjee, S.S., & Kumar, V. (2014). Adaptogenic potential of andrographolide: An active principle of the king of bitters (*Andrographis paniculata*). *Journal of traditional and complementary medicine*, 5(1), 42–50.
- Tripathi A., Das A., & Kar S.K. (2019) Biopsychosocial model in contemporary psychiatry: current validity and future prospects. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 41(6):582–585.
- Turkmen B.A., Yazici E., Erdogan D.G., Suda M.A., & Yazici A.B. (2021) BDNF, GDNF, NGF and Klotho levels and neurocognitive functions in acute term of schizophrenia. *BMC Psychiatry*, 21(1):562.
- Whittle L., Chapman R., van Diepen M., Rybicki E.P., & Williamson A.L. (2022). Characterization of a novel chimeric theileria parva p67 Antigen which incorporates into virus-like particles and is highly immunogenic in mice. *Vaccines*, 10(2):210.
- Wigner P., Synowiec E., Czarny P., Bijak M., Jóźwiak P., Szemraj J., Gruca P., Papp M., & Śliwiński T. (2020). Effects of venlafaxine on the expression level and methylation status of genes involved in oxidative stress in rats exposed to a chronic mild stress. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(10):5675-5694.
- Wohleb E.S., Hanke M.L., Corona A.W., Powell N.D., Stiner L.M., Bailey M.T., Nelson R.J., Godbout J.P., & Sheridan J.F. (2011). Beta-Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 31:6277–6288.

- Won E., & Kim Y.K. (2020). Neuroinflammation-associated alterations of the brain as potential neural biomarkers in anxiety disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18):6546.
- Won J.H., Jin M., Na Y.G., Song B., Yun T.S., Hwang Y.R., Lee S.R., Je S., Kim J.Y., Lee H.K., & Cho C.W. (2023). The combinative strategy for improving the intestinal stability and cellular absorption of curcumin by enteric coating of the optimized nanostructured lipid carriers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 89:105108.
- World Health Organization. Mental disorders. (8 June 2022) Assessed 5 September 2022. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>
- Yen C.C., Liang Y.K., Cheng C.P., Hsu M.C., & Wu Y.T. (2020). Oral bioavailability enhancement and anti-fatigue assessment of the andrographolide loaded solid dispersion. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7):2506.
- Yuan X., Xu W., Yan Z., Xu X., Chen Y., Chen S., & Wang P. (2022). Andrographolide exerted anti-inflammatory effects thereby reducing sex hormone synthesis in LPS-induced female rats, but had no effect on hormone production in healthy ones. *Frontiers in Pharmacology*, 13:980064.
- Zha S., Liu H., Li H., Li H., Wong K.L., & All A.H. (2024). Functionalized nanomaterials capable of crossing the blood-brain barrier. *ACS Nano*, 18(3):1820-1845.
- Zhang J.J., Gao T.T., Wang Y., Wang J.L., Guan W., Wang Y.J., Wang C.N., Liu J.F., & Jiang B. (2019). Andrographolide exerts significant antidepressant-like effects involving the hippocampal BDNF system in mice. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 22(9):585-600.
- Zhang L., Bao M., Liu B., Zhao H., Zhang Y., Ji X., Zhao N., Zhang C., He X., Yi J., Tan Y., Li L., & Lu C. (2020). Effect of andrographolide and its analogs on bacterial infection: a review. *Pharmacology*, 105(3-4):123–34.
- Zhang X., & Poo M.M. (2010). Progress in neural plasticity. *Science China Life Sciences*, 53(3):322-329.
- Zhang Y., Bi X., Adebisi O., Wang J., Mooshekhian A., Cohen J., Wei Z., Wang F., & Li X.M. (2019). Venlafaxine improves the cognitive impairment and depression-like behaviors in a

cuprizone mouse model by alleviating demyelination and neuroinflammation in the brain. *Frontiers in Pharmacology*, 10:332.

Zhou Y., Zhen Y., Wang G., & Liu B. (2022). Deconvoluting the complexity of reactive oxygen species (ROS) in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroanatomy*, 16:910427.

Zhu F.D., Hu Y.J., Yu L., Zhou X.G., Wu J.M., Tang Y., Qin D.L., Fan Q.Z., & Wu A.G. (2021). Nanoparticles: a hope for the treatment of inflammation in CNS. *Frontiers in Pharmacology*, 12:683935.

Zwain T., Alder J.E., Sabagh B., Shaw A., Burrow A.J., & Singh K.K. (2021). Tailoring functional nanostructured lipid carriers for glioblastoma treatment with enhanced permeability through in-vitro 3D BBB/BBTB models. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 121:111774.

กรมสุขภาพจิต. รายงานจำนวนผู้ป่วยในเฉลี่ยต่อวัน ที่มารับบริการ หน่วยงานในสังกัดฯ ประจำปี พ.ศ. 2565 (ตุลาคม 2564 - กรกฎาคม 2565). สืบค้นเมื่อวันที่ 4 กันยายน 2565. ที่มา <https://dmh.go.th/report/ipatientavg/patient1.asp?noyear=2565>



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

หนังสืออนุมัติการพิจารณาจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง
คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์





(Renew)

ANIMAL USE PROTOCOL APPROVAL

Protocol Number 021/2021

Animal Protocol Title

(Thai).....การเปลี่ยนแปลงประสาทพฤติกรรม การออกอนุมูลอิสระและการอักเสบของสมองโพรงและสารสกัด.....
สมุนไพรธรรมชาติที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบในแบบจำลองสัตว์ทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวาน.....
อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน และการอักเสบเชิงระบบ

(English).....The changes of neurobehavior and antioxidative stress and anti-inflammatory status of.....
the extracted compounds and nanocompounds from anti-inflammatory herbs in the.....
animal models of diabetes, Alzheimer and Parkinson diseases and systemic inflammation.....

Main Project/Proposal Title (if available)

(Thai).....

(English).....

Principal Investigator

Name-Surname (Thai).....ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรวุฒ ลากมณี

Name-Surname (English).....Assistant Professor Dr. Sarawut Lapmanee

Affiliation (Thai).....คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

Affiliation (English).....Faculty of Medicine, Siam University

Location of Animal Housing.....Laboratory Animal Center, Thammasat University

Location of Animal Experiments.....Laboratory Animal Center, Thammasat University

This Animal Protocol Established under Ethical Principles and Guidelines for the Use of
 Animals, National Research Council of Thailand and Approved by Animal Care and Use Committee
 of Thammasat University.

(Thunyatorn Yinsoo, DVM)

Chair of Animal Ethical and Post Approval
 Monitoring Subcommittee
 Thammasat University

(Associate Professor Dr. M.L. Pinibhand Paribatra)

Vice Rector for Research and Innovation
 Chair of Animal Care and Use Committee
 Thammasat University

Expiration Date

14 August, 2025

ภาคผนวก ข

นิพนธ์ต้นฉบับบทความวิจัย

Sarawut Lapmanee, Natchanon Rimsueb, Phichaporn Bunwatcharaphansakun, Katawut Namdee, Prapimpun Wongchitrat, Sakkarin Bhubhanil, Nattapon Supkamonseni, Natthawut Charoenphon, Anjaree Inchan, Rattaporn Saenmuangchin, Mattaka Khongkow. (202X). Safety and effectiveness of andrographolide-loaded nanostructured lipid carriers on stress-related behaviors and hippocampal morphology in mice with neuroinflammation. *Scientific Reports*. (Submission).

ภาคผนวก ค

การเข้าร่วมนำเสนอผลงานวิจัย

Sarawut Lapmanee, Sakkarin Bhubhanil, Nattapon Supkamonseni, Siriwan Sriwong, Kakawut Namdee, Mattaka Khongkow. Andrographolide-loaded lipid nanoparticles migrate anxiety and inflammation in the gut-brain dysbiosis induced by tumor necrosis factor-alpha in mice The International Conference on Neuroscience and Brain Health 2024 (ICNB2024) & The 27th Thai Neuroscience Society Annual Conference (TNS27). 8-10 May 2024. Amari Hua Hin Resort, Hua Hin, Thailand.



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์
ตำแหน่ง	อาจารย์ประจำ สาขาสรีรวิทยา
สถานที่ทำงาน	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม แขวงบางหว้า เขตภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (กายภาพบำบัด) พ.ศ. 2551 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาการออกกำลังกาย) พ.ศ. 2554 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (สรีรวิทยา-ประสาทวิทยาศาสตร์) พ.ศ. 2560 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย คณะวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสุขภาพ มหาวิทยาลัยสตาร์บูร์ก ประเทศฝรั่งเศส

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ

สรีรวิทยา, ประสาทวิทยาศาสตร์, พฤติกรรมศาสตร์, ประสาทเวชวิทยา

ประวัติการได้รับทุนวิจัย (หัวหน้าโครงการวิจัย)

1. ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยสยาม ปี พ.ศ. 2561
2. ทุนวิจัยโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ต่อยอด รุ่นที่ 3 ปี พ.ศ. 2561
3. ทุนสมทบการวิจัยเพิ่มเติม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ปี พ.ศ. 2562
4. ทุนอุดหนุนการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ปี พ.ศ. 2563
5. ทุนส่งเสริมการวิจัยโรคอุบัติใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ปี พ.ศ. 2564
6. ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่
สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปี พ.ศ. 2564
7. ทุนอุดหนุนการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ปี พ.ศ. 2565
8. ทุนสนับสนุนงานวิจัยมูลฐาน กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปี พ.ศ. 2566
9. ทุนสมทบการวิจัยเพิ่มเติม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ปี พ.ศ. 2566
10. ทุนสนับสนุนงานวิจัยมูลฐาน กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปี พ.ศ. 2567

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (5 ปีย้อนหลัง)

1. Thongchote K, Chinwaro U, **Lapmanee S***. Effects of scapulothoracic exercises on chest mobility, respiratory muscle strength, and pulmonary function in male COPD patients with forward shoulder posture: A randomized controlled trial. *F1000Res*. 2024;11:1284. [Corresponding author*]
2. **Lapmanee S**, Bhubhanil S, Wongchitrat P, Charoenphon N, Inchan A, Ngemsutivorakul T, Dechbumroong P, Khongkow M, Namdee K. Assessing the safety and therapeutic efficacy of cannabidiol lipid nanoparticles in alleviating metabolic and memory impairments and hippocampal histopathological changes in diabetic Parkinson's rats. *Pharmaceutics*. 2024;16(4):514.
3. **Lapmanee S**, Supkamonseni N, Bhubhanil S, Treesaksrisakul N, Sirithanakorn C, Khongkow M, Namdee K, Surinlert P, Tipbunjong C, Wongchitrat P. Stress-induced changes in cognitive function and intestinal barrier integrity can be ameliorated by venlafaxine and synbiotic supplementations. *PeerJ*. 2024;12:e17033.
4. Khawcharoenporn T, Kondo S, Chaiear N, Suvarnabhumi K, **Lapmanee S**. Factors affecting research conduct and publication among Thai medical students in university-affiliated medical schools. *J Acad Ethics*. 2024.
5. Wattanapisit A, **Lapmanee S***, Chaovalit S, Lektip C, Chotsiri P. Prevalence of physical activity counseling in primary care: a systematic review and meta-analysis. *Health Promot Perspect*. 2023;13(4):254–266. [Corresponding author*]
6. Talodthaisong C, Patramanon R, Thammawithan S, **Lapmanee S**, Maikaeo L, Sricharoen P, Khongkow M, Namdee K, Jantimaporn A, Kayunkid N, Hutchison JA, Kulchat S. A shear-thinning, self-healing, dual-cross linked hydrogel based on gelatin/vanillin/Fe³⁺/AGP-AgNPs: synthesis, antibacterial and wound-healing assessment. *Macromol Biosci*. 2023.
7. **Lapmanee S**, Bhubhanil S, Sriwong S, Yuajit C, Wongchitrat P, Teerapornpantakit J, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu J, Charoenphandhu N. Oral calcium and vitamin D supplements differentially alter exploratory, anxiety-like behaviors and memory in male rats. *PLOS ONE*. 2023.
8. Songphaeng T, **Lapmanee S**, Bhubhanil S, Momdee K, Rojviriyi C, Kitsahawong K, Chailertvanitkul P, Welbat JU, Morkmued S. Atomoxetine and Escitalopram migrate the derangement of the temporomandibular joint morphologic and histologic changes in rats exposed to stress-induced depression. *J Oral Sci*. 2023.
9. Lektip C, Chaovalit S, Wattanapisit A, **Lapmanee S**, Nawarat J, Yaemrattanakul W. Home hazard modification programs for reducing falls in older adults: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ*. 2023;11:e15699.

10. Wittayapun Y, Nawarat J, **Lapmanee S**, Mackenzie L, Lektip C. Reliability of the 44-question home fall hazard assessment tool and personal characteristics associated with home hazards among the Thai elderly. *F1000Res*. 2023;12:8.
11. **Lapmanee S***, Bhubhanil S, Sriwong S, Khongkow M, Namdee K, Wongchitrat P, Pongkorpsakol P. Venlafaxine and synbiotic attenuate learned fear-like behavior and recognition memory impairment in immobilized-stressed rats. *Physiol Pharmacol*. 2023; 27(2):171–181. [Corresponding author*]
12. Suntornsaratoon P, Thongklam T, Saetae T, Kodmit B, **Lapmanee S**, Malaivijitmond S, Charoenphandhu N, Krishnamra N. Running exercise with and without calcium supplementation from tuna bone reduced bone impairment caused by low calcium intake in young adult rats. *Sci Rep*. 2023;13(1):9568.
13. Benjaponpitak A, Sawaengtham T, Thaneerat T, Wanaratna K, Chotsiri P, Rungsawang C, Bhubhanil S, Charoensuk S, Benjaponpitak S, **Lapmanee S**, Sirinavin S. Effect of *Andrographis paniculata* treatment for nonimmune patients with early-stage COVID-19 on the prevention of pneumonia: a retrospective cohort study. *Arch Intern Med Res*. 2023;6:35–43.
14. Thongchote K, Sangchuchuenjit C, Vichaichotikul W, Choosaranon N, Kulsiri N, Lopansri P, Jaysrichai T, **Lapmanee S**. The functional correction of forward shoulder posture with kinesiotape improves chest mobility and inspiratory muscle strength: a randomized controlled trial. *Ann Appl Sport Sci*. 2023;11(2):e1138.
15. Thongchote K, Threetepchanchai K, Chuwijit A, **Lapmanee S**. Pilot study on improvement in respiratory function in sedentary young female adults with forward shoulder posture following scapulothoracic exercises: a randomized controlled trial. *Adv Rehab*. 2023;37(1):23–32.
16. Lektip C, **Lapmanee S**, Petsirasan R, Chaipinyo K, Lektip S, Nawarat J. Construction of the short-form Thai-home fall hazard assessment tool (Thai-HFHAT-SF) and testing its validity and reliability in the elderly. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(9):5187.
17. Bhubhanil S, Talodthaisong C, Khongkow M, Namdee K, Wongchitrat P, Yingmema W, Hutchison JA, **Lapmanee S***, Kulchat S. Enhanced wound healing properties of guar gum/curcumin-stabilized silver nanoparticle hydrogels. *Sci Rep*. 2021;11(1):21836. [Corresponding author*]
18. Reamtong O, **Lapmanee S**, Tummatom J, Palavong N, Thongsornkleeb C, Ruchirawat S. Synthesis of benzoazepine derivatives via azide rearrangement and evaluation of their antianxiety activities. *ACS Med Chem Lett*. 2021.

19. Leektip C, **Lapmanee S**, Rattananupong T, Lohsoonthorn V, Vorayingyong A, Woratanarat T, Sirisuk KO, Suttanon P, Petsirasan R, Kitidumrongsuk P, Jiamjarasrangi W. Predictive validity of three home fall hazard assessment tools for older adults in Thailand. *PLoS One*. 2020;15(12):e0244729.
20. Klosen P, **Lapmanee S**, Schuster C, Guardiola B, Hicks D, Pevet P, Felder-Schmittbuhl MP. MT1 and MT2 melatonin receptors are expressed in nonoverlapping neuronal populations. *J Pineal Res*. 2019:e12575.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ (5 ปีย้อนหลัง)

1. Thongchote K, Angnanon K, Surpaitoon C, Saikam P, **Lapmanee S**. Efficacy of muscle energy technique of pectoral muscles on forward shoulder posture, chest expansion, respiratory muscle strength, and lung capacity in sedentary students: a preliminary study. *Journal of Safety and Health*. 15(2):2022:211–225. (TCI-1)
2. Danviboon K, Sripradite S, Tangbumrungskul P, Sangkanjanavanich C, Pruksaseat C, Jeamanukoolkit P, Saijai K, Pongputcharapun K, Bhubhanil S, **Lapmanee S***. The effect of heat on sperm quality and male infertility. *Journal of Medicine and Health Sciences*. 2021. (TCI-1) [Corresponding author*]
3. Pongpidet S, Surawattanasitpa T, Thanakijborisut K, Seenprachawong B, Srisuwan N, Chatkittikunwong M, Saengkrajang P, Promkaew W, Phaocharoen C, Thodthankhun T, **Lapmanee S***. Risk factors and effective treatments of postpartum depression in young adult mothers. *Vajira Medical Journal: Journal of Urban Medicine*. 2021;65(3):211–220. (TCI-2) [Corresponding author*]
4. Sriwong S, Kotsaouppara N, Chawmuangkong K, Tingpej P, Bhubhanil S, **Lapmanee S***. The assessment and improvement of microbiological environmental quality in the laboratory animal center, Thammasat University, Thailand. *Journal of Safety and Health*. 13(2):2020:176–191. (TCI-1) [Corresponding author*]
5. Sukcharoen W, Tangaromsuk P, Sontiatchara M, Waithayakul K, Savedkairop C, Pooongpet J, Kengkoom R, Bhubhanil S, **Lapmanee S***. The study on Thailand's particulate matter 2.5 (PM 2.5) management in accordance with the World Health Organization (WHO) guidelines. *Vajira Medical Journal: Journal of Urban Medicine*. 2020;64(5):345–56. (TCI-2) [Corresponding author*]
6. Leektip C, Woratanarat T, Bhubhanil S, **Lapmanee S***. Risk factors for falls in elderly. *Journal of Medicine and Health Sciences*. 2019;26(1):85–103. (TCI-1) [Corresponding author*]