นิพนธ์ต้นฉบับ (Original article)

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดสำหรับทดลองการอดอาหารในแมลงหวี่และจำนวนแมลงหวี่ที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณการกินอาหาร

ปณาลี เพชรรัตน์ (วท.บ.) และ เกรียง กาญจนวตี (วท.ด.)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

ความเป็นมา การจำกัดอาหารคือการลดปริมาณการบริโภคซึ่งพบว่าช่วยเพิ่มอายุได้ เนื่องจากอาหารแต่ละชนิดมีองค์ประกอบแตกต่างกัน การลดปริมาณอาหารแล้วมีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มอายุจึงมีค่าแตกต่างกัน ดังนั้นการลดปริมาณยีสต์สกัดซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนชนิดหนึ่ง เพื่อให้เกิดการเพิ่มอายุของแมลงหวี่จึงแตกต่างไปจากแหล่งโปรตีนชนิดอื่น นอกจากนี้ชนิดและปริมาณของอาหารอาจส่งผลต่อปริมาณอาหารที่แมลงหวี่กิน จึงต้องมีวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณการกินอาหาร

วัตถุประสงค์ เพื่อทราบความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เป็นส่วนประกอบของอาหารสำหรับการจำกัดอาหารและอาหารที่ให้กินอย่างเต็มที่ และเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณการกินอาหาร

วัสดุและวิธีการ เปรียบเทียบการอยู่รอดของแมลงหวี่ในอาหารที่มียีสต์สกัดร้อยละ 0.25 0.5 1 5 และ 10 (w/v) กับชุดการทดลองควบคุมที่ใช้ยีสต์แห้งความเข้มข้น ร้อยละ 10 (w/v) หาความแตกต่างการอยู่รอดด้วย log-rank test อัตราความชราที่เกิดขึ้นด้วย Gompertz model และวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Brilliant Blue FCF No.1 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร จากแมลงหวี่จำนวน 10 20 และ 30 ตัว ที่ผ่านการให้อาหารที่มีสีย้อมดังกล่าวผสมอยู่ โดยสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 300 ไมโครลิตร

ผลการศึกษา จากการทดสอบอายุของแมลงหวี่เมื่อให้อาหารชนิดต่าง ๆ โดยใช้ค่ากลางและ log-rank test พบว่าช่วงความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ที่สอดคล้องกับทฤษฎีการจำกัดอาหารสำหรับแมลงหวี่เพศเมียคือ ความเข้มข้นยีสต์สกัดระหว่างร้อยละ 1–5 (w/v) ในขณะที่แมลงหวี่เพศผู้คือ ความเข้มข้นยีสต์สกัดในช่วงร้อยละ 0.5–10 (w/v) สำหรับการวิเคราะห์โดยใช้ Gompertz model พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5–10 (w/v) ไม่สอดคล้องกับการวิเคราะห์โดยใช้ค่ากลางอายุ มีเพียงที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 (w/v) เท่านั้นที่สอดคล้องกับค่ากลางอายุทั้งแมลงหวี่เพศผู้และเพศเมีย สำหรับการตรวจสอบปริมาณการกินอาหารพบว่าแมลงหวี่ 10 ตัว ให้ค่าวัดการดูดกลืนแสงที่ 0.539

สรุป อาหารที่มีปริมาณยีสต์สกัดเหมาะสมต่อการนำไปทดลองการอดอาหารของแมลงหวี่ ทั้งแมลงหวี่เพศผู้และเพศเมีย คือ อาหารที่มียีสต์สกัดร้อยละ 1 (w/v) สามารถใช้ทำให้เกิดการจำกัดอาหาร และ อาหารที่มียีสต์สกัดร้อยละ 5 (w/v) สามารถใช้ทำให้เกิดการกินได้อย่างเต็มที่ จำนวนแมลงหวี่ที่ให้ค่าดูดกลืนแสงที่เหมาะสม คือ 10 ตัว

คำสำคัญ การยืดอายุ ความชรา แมลงหวี่ ยีสต์สกัด

ผู้นิพนธ์ที่รับผิดชอบ เกรียง กาญจนวตี
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
กรุงเทพฯ ประเทศไทย
E-mail: Krieng.K@chula.ac.th

วันที่รับบทความ : สิงหาคม 2562 **วันที่ตอบรับบทความ : พฤศจิกายน 2562**

Fasting experiments in Drosophila with concentrations of yeast extract to quantify the optimal number of Drosophila for food consumption assay

Panalee Petcharat (B.Sc.) and Krieng Kanchanawatee (Ph.D.)

Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

Abstract

Background Dietary restriction is a reduction in food consumption confirmed to extend lifespan. However, due to the different nutrient compositions of each type of food, the consumption reduction that yields the most efficient life extension is varied. Experiments were carried out with Drosophila food – with a reduced concentration of yeast extract (to maximize lifespan), which is different from other types of protein sources. Furthermore, the types and quantities of food may affect the consumption level of Drosophila. Therefore, an optimized method for quantifying consumption is required.

Objective To investigate the optimal yeast extract concentrations used in both restricted and fully fed Drosophila diets, and to optimize a method for quantifying Drosophila consumption.

Materials and Methods The survival ratios of Drosophila fed with diets containing 0.25, 0.5, 1, 5 and 10 percent (w/v) yeast extracts were compared with Drosophila on a restricted diet control using only 10 percent (w/v) dried yeast. The log-rank test was used to compare the survival distributions. The Gompertz model was adopted to calculate aging rates. The Brilliant Blue FCF No.1 previously fed to Drosophila was extracted from 10, 20 and 30 flies in 300 µL of phosphate buffered saline with measured absorbance at 625 nm.

Results The medians and log-rank tests compared between the survival distributions of each diet regimen revealed the ranges in yeast extract concentration in correspondence with the dietary restriction theory were 1 – 5 percent (w/v) in females and 0.5 – 10 percent (w/v) in males. However, the ageing rates calculated from the Gompertz model did not coincide with the medians. Only the ageing rates of the treatments with 0.25 percent (w/v) yeast extract in both female and male flies matched the medians. For the consumption assay, ten fly extracts gave the absorbance at 0.539.

Conclusion The proper yeast extract concentrations that could be implemented in both female and male Drosophila as restricted and fully fed diets were 1 and 5 percent (w/v), respectively. The appropriate number of Drosophila for the consumption assay was ten flies.

Keywords ageing, *Drosophila melanogaster*, longevity, yeast extract

Corresponding author Krieng Kanchanawatee
Department of Biology, Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
E-mail: Krieng.K@chula.ac.th

Recive Date : August 2019 **Accepted Date : November 2019**

อ้างอิง
ปณาลี เพชรรัตน์, เกรียง กาญจนวตี. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดสำหรับทดลองการอดอาหารในแมลงหวี่ และจำนวนแมลงหวี่ที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณการกินอาหาร. บูรพาเวชสาร. 2563; 7(1): 1-20.

Citation
Petcharatand P, Kanchanawatee K. Fasting experiments in Drosophilawith concentrations of yeast extract to quantify the optimal number of Drosophila for food consumption assay. BMJ. 2020; 7(1): 1-20.

บทนำ

การจำกัดอาหาร (dietary restriction, DR) คือการลดปริมาณอาหารที่บริโภค ซึ่งเป็นอาหารที่ให้พลังงาน ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต[1] และ ไขมัน[2] จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสามารถทำให้ยืดอายุได้มากขึ้นร้อยละ 16–300[3-4] การศึกษาการจำกัดอาหารจากรายงานก่อนหน้า พบว่าแหล่งของโปรตีนสามารถมาได้จากหลายแหล่ง เช่น ยีสต์แห้งสำเร็จรูป[5-6] และ ยีสต์สกัด[1,5,7-8] ซึ่งแต่ละชนิดให้ปริมาณและสัดส่วนของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน[6] การกำหนดความเข้มข้นของอาหารที่ใช้ทดลองทั้งอาหารที่ทำให้เกิดการจำกัดอาหารและอาหารที่ทำให้เกิดการกินอย่างเต็มที่ จึงต้องมีค่าที่ถูกต้องและส่งผลกระทบที่แตกต่างกันต่ออายุ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้จากยีสต์สกัดที่ทำให้เกิดการจำกัดอาหารและอาหารที่ทำให้เกิดการกินอย่างเต็มที่

รูปแบบการตายของแมลงหวี่มีปัจจัยเกี่ยวข้อง คือ อัตราการตายเริ่มต้น (initial mortality rate, IMR) เป็นความเสี่ยงที่จะเกิดการตายของจุดเริ่มต้นในระยะตัวเต็มวัย และอัตราความชรา (rate of ageing, RoA) ซึ่งเป็นอัตราการตายที่จำเพาะกับอายุเมื่ออายุมากขึ้นในรูปแบบการถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ที่เรียกว่า Gompertz model คือ $\ln(\mu_x) = \ln(IMR) + (RoA)x$ เมื่อนำข้อมูลมาสร้างแผนภาพการกระจาย (scatter plot) และหาเส้นแนวโน้มแล้ว ค่าอัตราความชราจะแสดงในรูปความชันกราฟ และ IMR จะอยู่ในรูปของจุดตัดแกน y[9-11]

เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองแล้ว แมลงหวี่สามารถเพิ่มจำนวนและเลี้ยงเพื่อทดลองได้ง่ายกว่า นอกจากนี้ยังใช้ศึกษาเทียบเคียงกับมนุษย์ ทั้งในด้านการเจริญพันธุศาสตร์ พฤติกรรม และ ความชราได้อย่างดี[(12-13)] ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาถึงปริมาณโปรตีนที่แมลงหวี่ได้รับ ซึ่งคือปริมาณยีสต์สกัดในอาหารที่ใช้ทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณโปรตีนที่ทำให้เกิดการจำกัดอาหาร นำไปสู่การยืดอายุแมลงหวี่ และปริมาณโปรตีนที่สูงพอทำให้แมลงหวี่กินอย่างเต็มที่ ซึ่งไม่ยืดอายุแมลงหวี่ และไม่ทำให้ตายทันทีในระยะเวลาอันสั้น

ถึงแม้ปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ สามารถเทียบเคียงกับอาหารที่แมลงหวี่ได้รับ แต่อาจไม่แม่นยำเนื่องจากแมลงหวี่ที่เลี้ยงในอาหารแต่ละชนิดอาจมีอัตราการกินอาหารที่ไม่เท่ากัน ดังนั้นอัตราการกินสามารถวัดได้โดยผสมสี Brilliant Blue FCF No. 1 ลงในอาหารเลี้ยง เมื่อนำแมลงหวี่มาบดและวัดการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร จะทราบอัตราการกินอาหารของแมลงหวี่[14-15] อย่างไรก็ดีจำนวนแมลงหวี่ที่เหมาะสมมีผลอย่างมากต่อความแม่นยำของการทดลอง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาจำนวนแมลงหวี่ที่น้อยที่สุดที่สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

ดังนั้น เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดที่เป็นส่วนประกอบในอาหารสำหรับการจำกัดอาหารและอาหารที่ให้กินอย่างเต็มที่ จึงต้องตรวจสอบการอยู่รอดและความชราที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงแมลงหวี่ในอาหารแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังหาวิธีที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณการกินอาหาร โดยการหาจำนวนตัวแมลงหวี่ที่เหมาะสมที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงที่เชื่อถือได้ เพื่อนำข้อมูลที่มีความแม่นยำของการวัดค่าสูงไปใช้ศึกษาผลของการอดอาหารที่มีต่ออายุแมลงหวี่ต่อไป

วิธีการศึกษา

1. การเลี้ยงแมลงหวี่ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้แมลงหวี่สปีชีส์ *Drosophila melanogaster* สายพันธุ์ Oregon-R-C จากศูนย์ KYOTO Stock Center (DGRC) เป็นโมเดลในการศึกษา เลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนซ์เป็นเวลา 12 ชั่วโมงเวลาเดิมของทุกวัน การเพาะเลี้ยงแมลงหวี่เพื่อการทดลองอ้างอิงจาก Lacovaara (1969)[16]

อาหารที่ใช้เพิ่มจำนวนแมลงหวี่ดัดแปลงจาก standard cornmeal medium ประกอบด้วย ยีสต์แห้งสำเร็จรูป 6.75 กรัม ผงถั่วเหลือง 3.9 กรัม ผงข้าวโพด 28.5 กรัม ผงวุ้น 2.25 กรัม กลูโคสไซรัป 30 มิลลิลิตร กรดโพรพิโอนิก 1.88 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 390 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมเมื่อเตรียมเสร็จสิ้นประมาณ 425 มิลลิลิตร[17]

2. การตรวจสอบอายุแมลงหวี่ในอาหารยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่างกัน เปรียบเทียบกับอาหารจากยีสต์แห้งสำเร็จรูป

2.1 การเตรียมอาหารที่ใช้ทดลอง

อาหารที่ใช้ทดลองทุกชนิด ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย ผงวุ้น 1.5 กรัม ซูโครส 5 กรัม methyl 4-hydroxybenzoate 300 ไมโครลิตร และกรดโพรพิโอนิก 3 มิลลิลิตร อาหารแต่ละชนิดจะมีชนิดและปริมาณของแหล่งโปรตีนแตกต่างกันไป โดยอาหาร 0.25Y เพิ่มยีสต์สกัด 0.25 กรัม, อาหาร 0.5Y เพิ่มยีสต์สกัด 0.5 กรัม, อาหาร 1Y เพิ่มยีสต์สกัด 1 กรัม, อาหาร 5Y เพิ่มยีสต์สกัด 5 กรัม, อาหาร 10Y เพิ่มยีสต์สกัด 10 กรัม, และ อาหาร DR ใช้เป็นชุดควบคุม ใช้ยีสต์แห้งสำเร็จรูป 10 กรัม แทนการใช้ยีสต์สกัด[5-6,18] ตวงใส่ขวดแก้วเลี้ยงแมลงหวี่ขวดละ 4 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมและการเลี้ยงแมลงหวี่ในอาหารชนิดต่าง ๆ

นำแมลงหวี่ระยะตัวเต็มวัยที่ 2 – 4 วัน มาแยกเพศผู้และเพศเมียออกจากกัน โดยจัดกลุ่มเพศเดียวกัน กลุ่มละ 50 ตัวต่อ 1 ขวดอาหาร เพื่อทดลองเปรียบเทียบระหว่างชนิดอาหาร และระหว่างเพศแมลงหวี่ การเลี้ยงแมลงหวี่ในอาหารชนิดต่าง ๆ ดัดแปลงจากวิธีการของ Grandison et al. (2009)[18] และ Bass et al. (2007)[5] โดยเปลี่ยนอาหารและบันทึกผลจำนวนตัวที่ตายและเซ็นเซอร์ (ไม่ได้ตายจากผลของอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น ตายเนื่องจากปีกติดกับอาหาร เป็นต้น) ทุก ๆ 3 วัน จนแมลงหวี่ทุกตัวในการทดลองตาย

3. การสร้างเส้นโค้งมาตรฐาน (standard curve) ของสีย้อม Brilliant Blue FCF No. 1 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ของสารละลาย Brilliant Blue FCF No. 1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.0002, 0.0003, 0.0004, 0.0005 และ 0.0006 (w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 0.8 (w/v) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ร้อยละ 0.02 (w/v) โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ร้อยละ 0.144 (w/v) และโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) ร้อยละ 0.024 (w/v) ในน้ำกลั่น ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.4 ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Brilliant Blue FCF No.1 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร โดยมีความยาวคลื่นอ้างอิงที่ 675 นาโนเมตร รวมทั้งหาสมการของกราฟเส้นตรงและค่า R^2 เพื่อใช้บอกค่าความแม่นยำของข้อมูลกับกราฟเส้นตรงที่ได้

4. การวัดปริมาณการกินอาหารของแมลงหวี่

การวัดปริมาณการกินอาหารของแมลงหวี่ดัดแปลงจากวิธีของ Lee et al. (2014)[14] และ Skorupa et al. (2008)[15] โดยทำการเลี้ยงแมลงหวี่จำนวน 50 ตัวต่อขวดอาหาร ในอาหาร 10Y ที่มี Brilliant Blue FCF No.1 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) ให้แมลงหวี่กินอาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อแมลงหวี่กินอาหารครบตามเวลา ทำการตัดหัวและบดแมลงหวี่จำนวน 10, 20 และ 30 ตัว ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ให้ละเอียดด้วยที่บด (pestle) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 10,000 G เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใส (supernatant) 200 ไมโครลิตร ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร โดยมีความยาวคลื่นอ้างอิงที่ 675 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบอายุจากการใช้สถิติ log-rank test โดยการคำนวณในโปรแกรม IBM SPSS Statistics 22.0 และเปรียบเทียบปรากฏการณ์การตายด้วย Gompertz model โดยใช้โปรแกรม MATLAB

จริยธรรมการวิจัยโดยใช้สัตว์ทดลอง

โครงการนี้ได้รับการรับรองโดยคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ เลขที่ U1-06626-2560 และกำจัดซากสัตว์ทดลองตามข้อบังคับของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

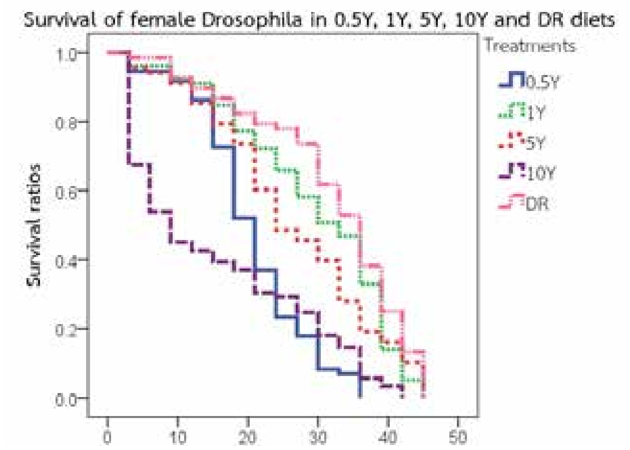
ผลการศึกษา/ ทดลอง

1. อายุของแมลงหวี่เมื่อให้อาหารชนิดต่าง ๆ และการวิเคราะห์โดยใช้ Gompertz model

เมื่อเลี้ยงแมลงหวี่เพศเมียด้วยอาหาร 0.5Y ซึ่งเป็นอาหารที่มีความเข้มข้นยีสต์สกัดต่ำที่สุด ให้ค่ากลางอายุ 21 วัน ซึ่งต่ำกว่าค่ากลางอายุที่ได้จากการเลี้ยงแมลงหวี่ด้วยอาหาร 1Y และ 5Y (33 และ 24 วัน ตามลำดับ; ตารางที่ 1) และจากการทดสอบทางสถิติด้วย log-rank test พบว่า การอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 1Y และ 5Y ($P < 0.001$; ตารางที่ 2) โดยแมลงหวี่ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y มีการตายเพิ่มมากขึ้นในช่วงกลางของการทดลอง (รูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงแมลงหวี่เพศเมียด้วยอาหาร 0.5Y ไม่ได้สอดคล้องกับทฤษฎีการจำกัดอาหารส่งผลให้มีอายุยืนยาวขึ้น

การเลี้ยงแมลงหวี่เพศเมียด้วยอาหาร 10Y ซึ่งเป็นอาหารที่มียีสต์สกัดสูงที่สุด ให้ค่ากลางของอายุน้อยที่สุดที่ 9 วัน ซึ่งต่ำกว่าค่ากลางอายุที่ได้จากการเลี้ยงแมลงหวี่ด้วยอาหาร 1Y และ 5Y (33 และ 24 วัน ตามลำดับ: ตารางที่ 1) และจากการทดสอบทางสถิติด้วย log-rank test พบว่า เช่นเดียวกับแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y การอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 10Y มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 1Y และ 5Y ($P < 0.001$; ตารางที่ 2) ถึงแม้การอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 10Y จะสอดคล้องกับทฤษฎีการจำกัดอาหาร แต่หากพิจารณากราฟการอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 10Y จะเห็นว่าการตายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะช่วง 10 วันแรกของการทดลอง (รูปที่ 1) ประกอบกับค่าอัตราการตายเริ่มต้น (initial mortality rate, IMR) ที่ 0.1 ซึ่งสูงที่สุดในอาหารทั้งหมด (ตารางที่ 3) ทำให้มีความเป็นไปได้ที่อาหาร 10Y จะส่งผลกระทบอื่นนอกเหนือจากอายุของแมลงหวี่ที่ได้รับอาหารดังกล่าว

เมื่อพิจารณาการอยู่รอดของแมลงหวี่เพศเมียที่เลี้ยงด้วยอาหาร 1Y และ 5Y พบว่าแมลงหวี่ทั้งสองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) โดยมีเพียงการอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 5Y เท่านั้นที่แตกต่างจากการอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร DR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; ตารางที่ 2) ในขณะที่การอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 1Y ไม่แตกต่างจากการอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร DR (ตารางที่ 2) ดังนั้นจึงสามารถใช้อาหาร 1Y เป็นอาหารสำหรับกระตุ้นให้เกิดการจำกัดอาหารส่งผลให้อายุยืนยาวขึ้น และอาหาร 5Y เป็นอาหารที่ไม่ส่งผลต่อการยืดอายุ



รูปที่ 1 การอยู่รอดของแมลงหวี่เพศเมียจำนวนตัวเริ่มต้น 100 ตัว ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 5 และ 10 (w/v) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหาร DR ที่มียีสต์แห้งสำเร็จรูปร้อยละ 5 (w/v)

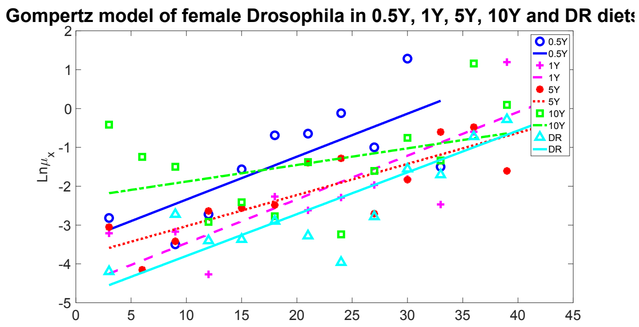
ตารางที่ 1 ค่ากลางอายุ (median) ของแมลงหวี่เพศเมียที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 5 และ 10 (w/v) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหาร DR ที่มียีสต์แห้งสำเร็จรูปร้อยละ 5 (w/v)

Treatments	Median			
	Estimate	Standard error	95% Confidence interval	
			Lower bound	Upper bound
0.5Y	21.00	.95	19.13	22.87
1Y	33.00	2.00	29.09	36.91
5Y	24.00	2.65	18.81	29.19
10Y	9.00	1.41	6.24	11.76
DR	36.00	1.50	33.06	38.95

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบเชิงคู่ (pairwise comparison) ของ log-rank (Mantel-Cox) test ในแมลงหวี่เพศเมียที่ทดสอบในอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 5 และ 10 (w/v) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหาร DR ที่มียีสต์แห้งสำเร็จรูปร้อยละ 5 (w/v)

Treatments	0.5Y		1Y		5Y		10Y	
	X^2	Sig.	X^2	Sig.	X^2	Sig.	X^2	Sig.
0.5Y								
1Y	40.90	.00						
5Y	18.33	.00	.91	.34				
10Y	0.44	.51	35.81	.00	19.93	.00		
DR	54.47	.00	2.88	.09	5.36	.02	47.31	.00

ในขณะที่ผลจากการวิเคราะห์อัตราความชราที่เกิดขึ้น (rate of ageing, RoA) จากการใช้ Gompertz model โดยพิจารณาเฉพาะค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจที่มากกว่าร้อยละ 59 (R^2 > 0.59)[19] นั่นคือในแมลงหวี่เพศเมียที่เลี้ยงด้วยอาหาร 1Y 5Y และ DR (R^2 = 0.7142 0.7342 และ 0.7396 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นอัตราความชราของแมลงหวี่เพศเมียที่เลี้ยงด้วยอาหาร 1Y 5Y และ DR มีค่า 0.1125 0.0801 และ 0.1075 ตามลำดับ (รูปที่ 2; ตารางที่ 3) ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากลางอายุของแมลงหวี่ที่อาหาร 1Y 5Y และ DR ซึ่งมีค่าเท่ากับ 33 24 และ 36 วัน ตามลำดับ จะเห็นว่าค่าอัตราความชราของแมลงหวี่เพศเมียที่เลี้ยงในอาหาร 5Y ไม่สอดคล้องกับค่ากลางอายุ (ตารางที่ 1)



รูปที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ลอการิทึมฐานธรรมชาติ (ln) ของการตายของแมลงหวี่เพศเมียและเวลา (วัน) โดยใช้จำนวนแมลงหวี่เพศเมียตัวเริ่มต้น 100 ตัว เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 5 และ 10 (w/v) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหาร DR ที่มียีสต์แห้งสำเร็จรูปร้อยละ 5 (w/v)

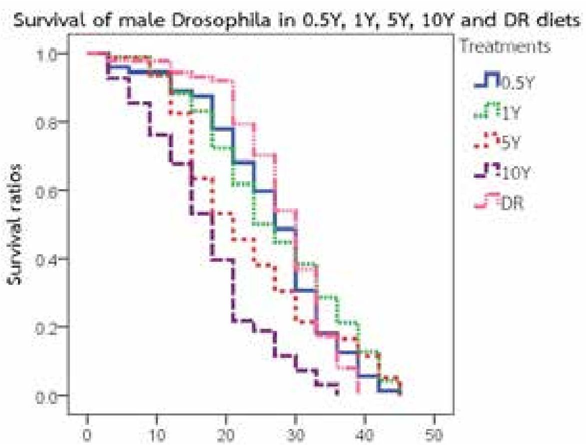
ตารางที่ 3 สมการ Gompertz ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (R^2) อัตราความชรา (rate of ageing, RoA) และ อัตราการตายเริ่มต้น (initial mortality rate, IMR) ในแมลงหวี่เพศเมียที่ทดสอบในอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 5 และ 10 (w/v) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหาร DR ที่มียีสต์แห้งสำเร็จรูปร้อยละ 5 (w/v)

	Gompertz model	R-squared	RoA	IMR
0.5Y	$\ln(\mu_x) = 0.11x - 3.45$	0.56	0.11	0.03
1Y	$\ln(\mu_x) = 0.11x - 4.59$	0.71	0.11	0.01
5Y	$\ln(\mu_x) = 0.08x - 3.83$	0.73	0.08	0.02
10Y	$\ln(\mu_x) = 0.043x - 2.31$	0.16	0.04	0.10
DR	$\ln(\mu_x) = 0.11x - 4.87$	0.74	0.11	0.01

ในด้านแมลงหวี่เพศผู้เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y 1Y และ 5Y ซึ่งเป็นอาหารที่มีความเข้มข้นยีสต์สกัดต่ำ ให้ค่ากลางอายุ 27 33 และ 24 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และจากการทดสอบทางสถิติด้วย log-rank test พบว่า การอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 1Y และ 5Y (P = 0.355 และ 0.299 ตามลำดับ; ตารางที่ 5) โดยแมลงหวี่เพศผู้ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y ไม่มีการตายที่มากกว่าการเลี้ยงในอาหาร 1Y และ 5Y เช่นในแมลงหวี่เพศเมีย (รูปที่ 3) แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยง

แมลงหวี่เพศผู้ด้วยอาหาร 0.5Y 1Y และ 5Y สอดคล้องกับทฤษฎีการจำกัดอาหารส่งผลให้มีอายุยืนยาวขึ้น

การเลี้ยงแมลงหวี่เพศผู้ด้วยอาหาร 10Y ซึ่งเป็นอาหารที่มียีสต์สกัดสูงที่สุด ให้ค่ากลางของอายุน้อยที่สุดที่ 18 วัน ซึ่งต่ำกว่าค่ากลางอายุที่ได้จากการเลี้ยงแมลงหวี่ด้วยอาหาร 0.5Y 1Y และ 5Y (27 24 และ 21 วัน ตามลำดับ; ตารางที่ 4) และจากการทดสอบทางสถิติด้วย log-rank test พบว่า การอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 10Y มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y 1Y และ 5Y (*P* < 0.001; ตารางที่ 5) แต่หากพิจารณากราฟการอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 10Y จะเห็นว่าการตายมิได้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะช่วง 10 วันแรกของการทดลองเช่นในแมลงหวี่เพศเมีย (รูปที่ 3) แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงแมลงหวี่เพศผู้ด้วยอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y สอดคล้องกับทฤษฎีการจำกัดอาหารส่งผลให้มีอายุยืนยาวขึ้น



รูปที่ 3 การอยู่รอดของแมลงหวี่เพศผู้จำนวนตัวเริ่มต้น 100 ตัว ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y ซึ่งยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 5 และ 10 (w/v) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหาร DR ที่มียีสต์แห้งสำเร็จรูปร้อยละ 5 (w/v)

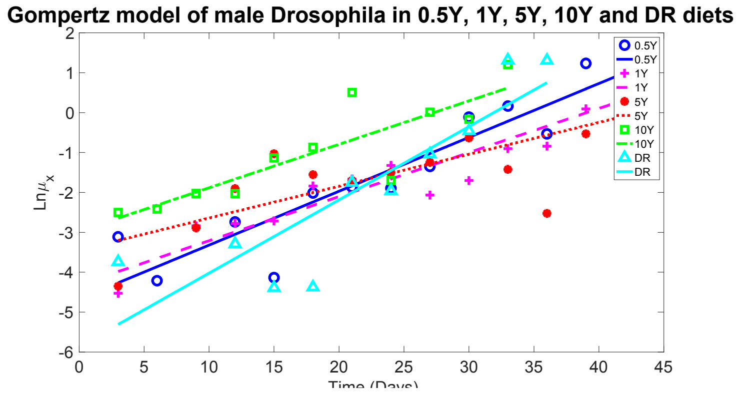
ตารางที่ 4 ค่ากลางอายุของแมลงหวี่เพศผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 5 และ 10 (w/v) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหาร DR ที่มียีสต์แห้งสำเร็จรูปร้อยละ 5 (w/v)

Treatments	Median			
	Estimate	Standard error	95% Confidence interval	
			Lower bound	Upper bound
0.5Y	27.00	1.21	24.63	29.38
1Y	24.00	1.82	20.43	27.56
5Y	21.00	1.99	17.10	24.90
10Y	18.00	1.07	15.91	20.09
DR	30.00	.93	28.18	31.82

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบเชิงคู่ของ log-rank test ในแมลงหวี่เพศผู้ที่ทดสอบในอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 5 และ 10 (w/v) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหาร DR ที่มียีสต์แห้งสำเร็จรูปร้อยละ 5 (w/v)

Treatments	0.5Y		1Y		5Y		10Y	
	X^2	Sig.	X^2	Sig.	X^2	Sig.	X^2	Sig.
0.5Y								
1Y	.86	.36						
5Y	1.08	.30	2.69	.10				
10Y	37.18	.00	43.98	.00	15.78	.00		
DR	.01	.91	1.01	.32	1.94	.16	58.48	.00

ในขณะที่ผลจากการวิเคราะห์อัตราความชราที่เกิดขึ้น (rate of ageing, RoA) จากการใช้ Gompertz model โดยเชื่อถือค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจที่มากกว่าร้อยละ 59 ($R^2 > 0.59$)[19] นั่นคือในแมลงหวี่เพศผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y 1Y 10Y และ DR (R^2 = 0.8599 0.8749 0.7459 และ 0.7692 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นอัตราความชรา มีค่าเท่ากับ 0.1350 0.1104 0.1089 และ 0.1836 ตามลำดับ (รูปที่ 4 และตารางที่ 6) ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากลางอายุของแมลงหวี่ที่เลี้ยงในอาหาร 0.5Y 1Y และ 10Y ซึ่งมีค่าเท่ากับ 27 24 และ 18 วัน ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า ค่าอัตราความชราของแมลงหวี่เพศผู้ที่เลี้ยงในอาหาร 0.5Y 1Y และ 10Y ไม่สอดคล้องกับค่ากลางอายุ (ตารางที่ 4)



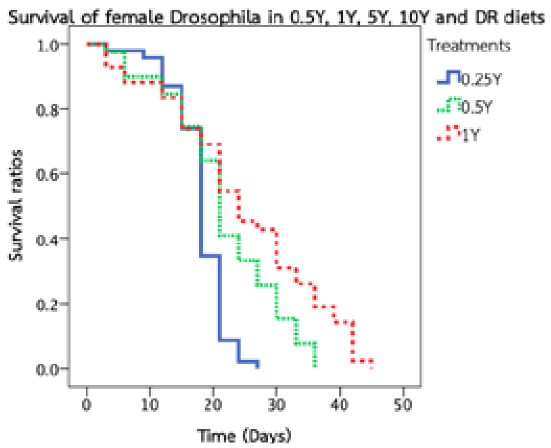
รูปที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ลอการิทึมฐานธรรมชาติ (ln) ของการตายของแมลงหวี่เพศผู้และเวลา (วัน) โดยใช้จำนวนแมลงหวี่เพศผู้ตัวเริ่มต้น 100 ตัว เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 5 และ 10 (w/v) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหาร DR ที่มียีสต์แห้งสำเร็จรูป ร้อยละ 5 (w/v)

ตารางที่ 6 สมการ Gompertz ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (R^2) อัตราความชรา (rate of ageing, RoA) และ อัตราการตายเริ่มต้น (initial mortality rate, IMR) ในแมลงหวี่เพศผู้ที่ทดสอบในอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 5 และ 10 (w/v) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหาร DR ที่มียีสต์แห้งสำเร็จรูปร้อยละ 5 (w/v)

	Gompertz model	R-squared	RoA	IMR
0.5Y	$\ln(\mu_x) = 0.14x - 4.67$	0.86	0.14	0.01
1Y	$\ln(\mu_x) = 0.11x - 4.31$	0.87	0.11	0.01
5Y	$\ln(\mu_x) = 0.08x - 3.44$	0.54	0.08	0.03
10Y	$\ln(\mu_x) = 0.11x - 2.97$	0.75	0.11	0.05
DR	$\ln(\mu_x) = 0.18x - 5.86$	0.77	0.18	0.00

จากผลการทดลองก่อนหน้าไม่สามารถบอกถึงผลการทดลองที่ความเข้มข้นยีสต์สกัดต่ำกว่าร้อยละ 0.5 (w/v) และเพื่อให้ทราบว่าแมลงหวี่เพศผู้มีค่ากลางอายุและสัดส่วนการอยู่รอดที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า ร้อยละ 0.5 (w/v) อย่างไร ผู้วิจัยจึงเพิ่มกลุ่มทดลองโดยเลี้ยงแมลงหวี่ด้วยอาหารที่มียีสต์สกัดร้อยละ 0.25 (w/v) คืออาหาร 0.25Y เปรียบเทียบกับอาหาร 0.5Y และ 1Y

แมลงหวี่เพศเมียเมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y ซึ่งเป็นอาหารที่มีความเข้มข้นยีสต์สกัดต่ำที่สุดให้ค่ากลางอายุ 18 วัน ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y และ 1Y (ให้ค่ากลางอายุ 21 และ 24 วัน ตามลำดับ; ตารางที่ 7) และจากการทดสอบทางสถิติด้วย log-rank test พบว่า การอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y และ 1Y ($P < 0.001$; ตารางที่ 8) โดยแมลงหวี่ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y มีการตายเพิ่มมากขึ้นในช่วงกลางของการทดลองที่ 10–20 วัน (รูปที่ 5) แสดงให้เห็นว่าเช่นเดียวกับการเลี้ยงแมลงหวี่เพศเมียด้วยอาหาร 0.5Y (รูปที่ 1) การเลี้ยงแมลงหวี่เพศเมียด้วยอาหาร 0.25Y ไม่ได้สอดคล้องกับทฤษฎีการจำกัดอาหารส่งผลให้มีอายุยืนยาวขึ้น



รูปที่ 5 การอยู่รอดของแมลงหวี่เพศเมียจำนวนตัวเริ่มต้น 50 ตัว ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 และ 1 (w/v) ตามลำดับ

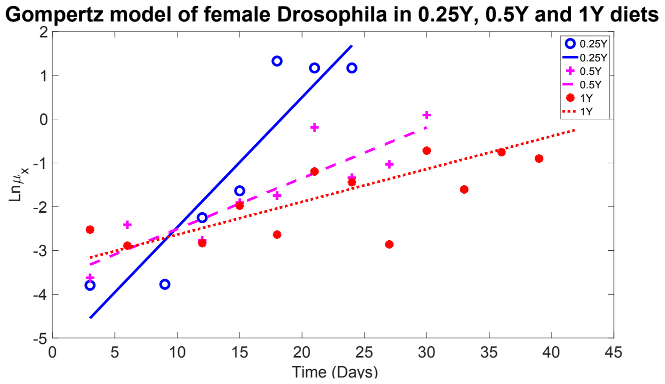
ตารางที่ 7 ค่ากลางอายุของแมลงหวี่เพศเมียที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 และ 1 (w/v) ตามลำดับ

Treatments	Median			
	Estimate	Standard error	95% Confidence interval	
			Lower bound	Upper bound
0.25Y	18.00	.54	16.95	19.06
0.5Y	21.00	1.02	18.99	23.01
1Y	24.00	2.64	18.83	29.17

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบเชิงคู่ของ log-rank test ในแมลงหวี่เพศเมียที่ทดสอบในอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 และ 1 (w/v) ตามลำดับ

Treatments	0.25Y		0.5Y	
	X^2	Sig.	X^2	Sig.
0.25Y				
0.5Y	12.68	.00		
1Y	20.38	.00	4.91	.03

ในขณะที่ผลจากการวิเคราะห์อัตราความชราที่เกิดขึ้น (rate of ageing, RoA) จากการใช้ Gompertz model โดยเชื่อถือค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจที่มากกว่าร้อยละ 59 (R^2 > 0.59)[19] นั่นคือในแมลงหวี่เพศเมียที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y (R^2 = 0.8580 0.7998 และ 0.6106 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นอัตราความชรามีค่าเท่ากับ 0.2968 0.1161 และ 0.07496 ตามลำดับ (รูปที่ 6; ตารางที่ 9) ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากลางอายุของแมลงหวี่เพศเมียที่เลี้ยงในอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y มีค่าเท่ากับ 18 21 และ 24 วัน ตามลำดับ นั่นคืออาหารที่ให้ค่ากลางอายุน้อย พบว่ามีอัตราความชราที่มาก และอาหารที่ให้ค่ากลางอายุมาก พบว่ามีอัตราความชราที่น้อย แสดงให้เห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y อัตราความชราที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับค่ากลางอายุของแมลงหวี่ (ตารางที่ 7)

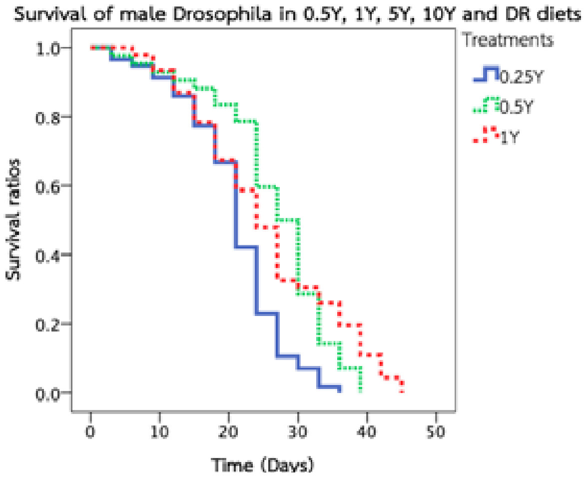


รูปที่ 6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ลอการิทึมฐานธรรมชาติ (ln) ของการตายของแมลงหวี่เพศเมียและเวลา (วัน) โดยใช้จำนวนแมลงหวี่เพศเมียตัวเริ่มต้น 50 ตัว เลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 และ 1 (w/v) ตามลำดับ

ตารางที่ 9 สมการ Gompertz ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (R^2) อัตราความชรา (rate of ageing, RoA) และ อัตราการตายเริ่มต้น (initial mortality rate, IMR) ในแมลงหวี่เพศเมียที่ทดสอบในอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 และ 1 (w/v) ตามลำดับ

	Gompertz model	R-squared	RoA	IMR
0.25Y	$\ln(\mu_x) = 0.30x - 5.44$	0.86	0.30	0.00
0.5Y	$\ln(\mu_x) = 0.12x - 3.67$	0.80	0.12	0.03
1Y	$\ln(\mu_x) = 0.07x - 3.39$	0.61	0.07	0.03

ในด้านผลการทดลองของแมลงหวี่เพศผู้ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y ซึ่งเป็นอาหารที่มีความเข้มข้นยีสต์สกัดต่ำที่สุด ให้ค่ากลางอายุ 21 วัน ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y และ 1Y (ให้ค่ากลางอายุ 27 และ 24 วัน ตามลำดับ; ตารางที่ 10) และจากการทดสอบทางสถิติด้วย log-rank test พบว่า การอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการอยู่รอดของแมลงหวี่ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 1Y และ 5Y ($P < 0.001$; ตารางที่ 11) โดยแมลงหวี่ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y มีการตายเพิ่มมากขึ้นในช่วงกลางของการทดลองที่ 10 – 30 วัน (รูปที่ 7) แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงแมลงหวี่เพศผู้ด้วยอาหาร 0.25Y ไม่ได้สอดคล้องกับทฤษฎีการจำกัดอาหารส่งผลให้มีอายุยืนยาวขึ้น



รูปที่ 7 การอยู่รอดของแมลงหวี่เพศผู้จำนวนตัวเริ่มต้น 50 ตัว ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 และ 1 (w/v) ตามลำดับ

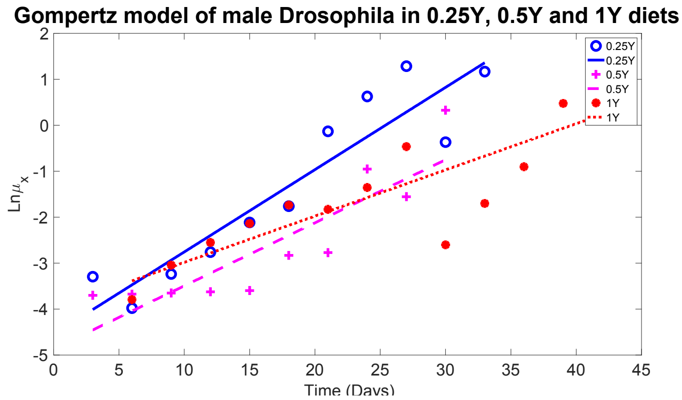
ตารางที่ 10 ค่ากลางอายุของแมลงหวี่เพศผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 และ 1 (w/v) ตามลำดับ

Treatments	Median			
	Estimate	Standard error	95% Confidence interval	
			Lower bound	Upper bound
0.25Y	21.00	.80	19.43	22.57
0.5Y	27.00	1.50	24.07	29.93
1Y	24.00	1.69	20.68	27.32

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบเชิงคู่ของ log-rank test ในแมลงหวี่เพศผู้ที่ทดสอบในอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 และ 1 (w/v) ตามลำดับ

Treatments	0.25Y		0.5Y	
	X^2	Sig.	X^2	Sig.
0.25Y				
0.5Y	17.72	.00		
1Y	10.39	.00	.21	.65

ในขณะที่ผลจากการวิเคราะห์อัตราความชราที่เกิดขึ้น (rate of ageing, RoA) จากการใช้ Gompertz model โดยเชื่อถือค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจที่มากกว่าร้อยละ 59 (R^2 > 0.59)[19] นั่นคือในแมลงหวี่เพศผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y (R^2 = 0.8665 0.7776 และ 0.7211 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นอัตราความชรามีค่าเท่ากับ 0.1791 0.1372 และ 0.1006 ตามลำดับ (รูปที่ 8; ตารางที่ 12) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบค่ากลางอายุของแมลงหวี่เพศผู้ที่เลี้ยงในอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งมีค่าเท่ากับ 21 27 และ 24 วัน ตามลำดับ ที่อาหาร 0.5Y และ 1Y ให้ค่ากลางอายุน้อยพบว่ามีอัตราความชราที่น้อย แสดงให้เห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหาร 0.5Y และ 1Y อัตราความชราที่เกิดขึ้นมิได้สอดคล้องกับค่ากลางอายุของแมลงหวี่ แต่เมื่อเปรียบเทียบค่ากลางอายุแมลงหวี่เพศผู้ในอาหาร 0.25Y พบว่าให้ค่ากลางอายุที่น้อยที่สุด แต่มีอัตราความชรามากที่สุด แสดงให้เห็นว่า ในอาหาร 0.25Y อัตราความชราที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับค่ากลางอายุของแมลงหวี่ (ตารางที่ 11) และสอดคล้องกับผลการทดลองในแมลงหวี่เพศเมีย (รูปที่ 6) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองแมลงหวี่เพศผู้ในอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y โดยมีอาหาร DR เป็นชุดควบคุมจะเห็นได้ว่า มีชุดการทดลองที่เป็นอาหารชนิดเดียวกัน คืออาหาร 0.5Y และ 1Y (อาหาร 0.5Y ให้ค่ากลางอายุ 27 วัน ทั้งสองการทดลอง ให้อัตราความชราเท่ากับ 0.1350 และ 0.1372; อาหาร 1Y ให้ค่ากลางอายุ 24 วัน ทั้งสองการทดลอง ให้อัตราความชรา 0.1104 และ 0.1006) ที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน (ตารางที่ 6 และ 12)



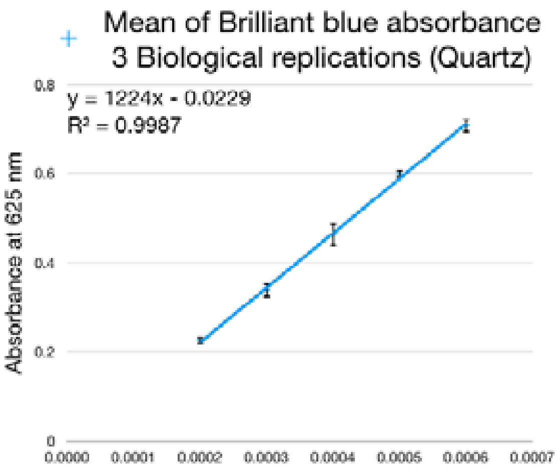
รูปที่ 8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ลอการิทึมฐานธรรมชาติ (ln) ของการตายของแมลงหวี่เพศผู้และเวลา (วัน) โดยใช้จำนวนแมลงหวี่เพศผู้ตัวเริ่มต้น 50 ตัว เลี้ยงด้วยอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 และ 1 (w/v) ตามลำดับ

ตารางที่ 12 สมการ Gompertz ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (R^2) อัตราความชรา (rate of ageing, RoA) และ อัตราการตายเริ่มต้น (initial mortality rate, IMR) ในแมลงหวี่เพศผู้ที่ทดสอบในอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งมียีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.25 0.5 และ 1 (w/v) ตามลำดับ

	Gompertz model	R-squared	RoA	IMR
0.25Y	$\ln(\mu_x) = 0.18x - 4.55$	0.87	0.18	0.01
0.5Y	$\ln(\mu_x) = 0.14x - 4.87$	0.78	0.14	0.01
1Y	$\ln(\mu_x) = 0.10x - 3.99$	0.72	0.10	0.02

2. จำนวนแมลงหวี่ที่เหมาะสมต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Brilliant Blue FCF No. 1

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของ Brilliant Blue FCF No. 1 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ พบว่าที่ความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 0.0002 – 0.0006 (w/v) ที่เหมาะสมต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 0.2–0.8 โดยความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Brilliant Blue FCF No.1 และค่าการดูดกลืนแสงเป็นสมการเส้นตรง ($y = 1224x – 0.0229$) ที่มีค่า R^2 หรือค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจสูง (0.9987; รูปที่ 9) แสดงให้เห็นว่าช่วงความเข้มข้นดังกล่าวสามารถใช้สร้างกราฟมาตรฐานได้ ดังนั้นจำนวนตัวแมลงหวี่ที่เหมาะสมต่อการวัดปริมาณ Brilliant Blue FCF No.1 ที่ถูกกินผ่านทางการผสมในอาหารของแมลงหวี่ คือ 10 ตัว ต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เนื่องจากให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร ที่อยู่ในช่วงการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐาน (0.539; ตารางที่ 13)



รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ของ Brilliant Blue FCF No. 1 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ที่ความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 0.0002 – 0.0008 (w/v)

ตารางที่ 13 การดูดกลืนแสงที่ 625 และ 675 นาโนเมตรของ Brilliant Blue FCF No. 1 ที่ได้จากการบดแมลงหวี่ที่ผ่านการกินอาหารผสม Brilliant Blue FCF No.1 จำนวน 10 20 และ 30 ตัว ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 300 ไมโครลิตร

Flies/300 µL phosphate buffered saline	Absorbance at 625 nm	Reference Absorbance at 675 nm
10	0.54	0.00
20	4.53	0.14
30	3.14	0.27

วิจารณ์

จากการเปรียบเทียบค่ากลางอายุของแมลงหวี่ ความเข้มข้นยีสต์สกัดในอาหารที่สามารถนำไปใช้ทดลองการอดอาหารของแมลงหวี่ได้มีความแตกต่างกันในแมลงหวี่เพศผู้และเพศเมีย นั่นคือแมลงหวี่เพศเมียสามารถใช้ความเข้มข้นยีสต์สกัดระหว่างร้อยละ 1 - 5 (w/v) ในขณะที่แมลงหวี่เพศผู้สามารถใช้ความเข้มข้นยีสต์สกัดในช่วงร้อยละ 0.5 - 10 (w/v) เนื่องจากที่ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวสอดคล้องกับทฤษฎีการจำกัดอาหาร ซึ่งมีรายงานในงานวิจัยก่อนหน้าคือ ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นมากขึ้นทำให้การอยู่รอดน้อยลงเนื่องจากผลของความเป็นพิษที่มากขึ้นตามความเข้มข้น โดยเปรียบเทียบกับยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1- 20 (w/v)[5] ในขณะที่การศึกษานี้พบว่า ความเข้มข้นยีสต์สกัดต่ำที่สุดคือร้อยละ 0.25 (w/v) ส่งผลให้เกิดการตายเป็นจำนวนมากทั้งแมลงหวี่เพศผู้และเพศเมีย และความเข้มข้นยีสต์สกัดที่ร้อยละ 0.5 (w/v) ส่งผลให้เกิดการตายของแมลงหวี่เพศเมีย ปรากฏการณ์ดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่ายีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) ทำให้แมลงหวี่ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีการอยู่รอดต่ำเนื่องจากอาหารไม่เพียงพอ[20] ในขณะที่อาหาร 10Y ให้ค่ากลางอายุแมลงหวี่น้อยทั้งเพศผู้และเพศเมีย แต่เนื่องจากรูปแบบของกราฟสัดส่วนการอยู่รอดที่แสดงให้เห็นว่า แมลงหวี่เพศเมียที่เลี้ยงด้วยอาหาร 10Y มีการตายอย่างรวดเร็วในช่วงต้นของการทดลอง คือที่ระหว่าง 0 – 10 วัน แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างเห็นได้ชัด ในอีกทางหนึ่งแมลงหวี่เพศผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหาร 10Y แม้จะมีค่ากลางอายุต่ำเช่นกันแต่รูปแบบของกราฟการอยู่รอดมิได้มีการตายมากผิดปกติในช่วงต้นของการทดลอง ทำให้อาหาร 10Y สามารถใช้ในการทดลองอดอาหารในแมลงหวี่เพศผู้ได้ แต่ไม่สามารถใช้ในแมลงหวี่เพศเมีย

ปัจจัยที่คาดว่าส่งผลให้ผลการทดลองในแมลงหวี่เพศผู้และเพศเมียแตกต่างกัน คือ จำนวนของเซลล์ไขมันในแมลงหวี่เพศผู้ที่มีการเพิ่มขึ้นในช่วงต้นระยะตัวเต็มวัย และลดลงในช่วงท้ายของระยะตัวเต็มวัย ในขณะที่จำนวนเซลล์ไขมันของแมลงหวี่เพศเมียค่อนข้างคงที่ รวมทั้งขนาดของเซลล์ไขมันในแมลงหวี่เพศผู้ที่เล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแมลงหวี่เพศเมีย[21] ทำให้แมลงหวี่เพศเมียที่เลี้ยงด้วยอาหาร 0.5Y ได้รับพลังงานไม่เพียงพอต่อร่างกาย และอีกปัจจัยหนึ่งคือการที่แมลงหวี่เพศเมียสามารถทนต่อสารพิษจากเห็ดพิษ[22] โลหะหนักแคดเมียม[23] และทองแดง[24] ได้น้อยกว่าแมลงหวี่เพศผู้ การรับยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 10Y ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงมาก ซึ่งอาจทำให้ยีสต์สกัดมีความเป็นพิษต่อแมลงหวี่เพศเมีย ทำให้แมลงหวี่เพศเมีย มีสัดส่วนการอยู่รอดในอาหาร 10Y ที่น้อยกว่าแมลงหวี่เพศผู้ และตายอย่างรวดเร็ว

แต่เนื่องจากจำนวนแมลงหวี่ในการทดลองนี้ใช้จำนวนเริ่มต้น 100 ตัว ในการทดลองการตรวจสอบอายุของแมลงหวี่ในอาหาร 0.5Y 1Y 5Y และ 10Y เปรียบเทียบกับอาหาร DR และจำนวนเริ่มต้น 50 ตัว ในการทดลองการตรวจสอบอายุของแมลงหวี่ในอาหาร 0.25Y 0.5Y และ 1Y ซึ่งแมลงหวี่ที่ใช้มีจำนวนน้อยกว่าในการทดลองที่มีมาก่อนหน้าที่ใช้จำนวนตัวแมลงหวี่จำนวน 200 - 3,000 ตัว[1,25] จึงอาจทำให้ผลการทดลองทั้งการหาค่ากลางอายุ ซึ่งส่งผลไปถึงการคำนวณ Gompertz model มีความคลาดเคลื่อนและค่านัยสำคัญทางสถิติที่ได้จากการใช้สถิติ log-rank test ของแมลงหวี่ที่เลี้ยงเปรียบเทียบกันระหว่างอาหารยีสต์สกัดร้อยละ 1 (w/v) และร้อยละ 5 (w/v) ที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการศึกษานี้สามารถให้ค่าความน่าจะเป็นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้า[20] โดยปัจจัยที่ทำให้ค่าความเชื่อมั่นในงานวิจัยนี้ ไม่เหมือนกับงานวิจัยก่อนหน้าอาจเนื่องมาจากชนิดของยีสต์สกัดที่ใช้มิได้เป็นชนิดเดียวกัน

จำนวนแมลงหวี่ที่ใช้ยังส่งผลต่อการคำนวณค่าอัตราความชราจาก Gompertz model ทำให้ในบางชุดการทดลองมีค่า R^2 น้อย คือน้อยกว่า 0.59[19] จึงไม่

สามารถนำค่าอัตราความชรามาอธิบายได้อย่างแม่นยำ แม้ว่าค่าอัตราความชราที่สามารถอธิบายได้สอดคล้องกับทฤษฎีการจำกัดอาหารมีเพียงอัตราความชราของแมลงหวี่ในอาหาร 0.25Y แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราความชราของอาหาร 0.5Y และ 1Y ที่มีอยู่ในการทดสอบอายุแมลงหวี่ทั้งสองชุดการทดลอง (ตารางที่ 6 และ 12) ซึ่งมิได้สอดคล้องกับทฤษฎีการจำกัดอาหาร แต่พบว่าให้ค่าอัตราความชราที่ใกล้เคียงกันมาก จึงสามารถช่วยยืนยันถึงความแม่นยำของผลการวิเคราะห์อัตราความชราได้ สาเหตุที่ไม่สามารถให้ค่าที่เท่ากันได้มีส่วนมาจากการที่จำนวนแมลงหวี่ที่ใช้มีจำนวนไม่เท่ากันคือ จำนวนเริ่มต้น 100 ตัวในการทดลองที่เปรียบเทียบกับชุดควบคุม DR แต่ใช้จำนวนเริ่มต้น 50 ตัวในการทดสอบอายุของการทดลองที่มีอาหาร 0.25Y

สรุป

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงช่วงปริมาณของยีสต์สกัดที่เหมาะสมในการทำการทดลองการอดอาหารของแมลงหวี่ โดยในแมลงหวี่เพศเมียและเพศผู้สามารถใช้ความเข้มข้นยีสต์สกัดระหว่างร้อยละ 1- 5 (w/v) และร้อยละ 0.5-10 ตามลำดับ หากต้องการใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดเท่ากันทั้งในแมลงหวี่เพศผู้และเพศเมีย ความเข้มข้นที่นำไปใช้ได้คือ ยีสต์สกัดร้อยละ 1 (w/v) และร้อยละ 5 (w/v) โดยอาหารยีสต์สกัดร้อยละ 1 (w/v) เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นอาหารที่ทำให้เกิดการจำกัดอาหาร ในขณะที่ยีสต์สกัดร้อยละ 5 (w/v) สามารถนำไปใช้เป็นอาหารที่ทำให้เกิดการกินอย่างเต็มที่ได้ จำนวนแมลงหวี่ที่ใช้ทดสอบการกินอาหารด้วย Brilliant Blue FCF No. 1 ใช้ 10 ตัวต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 300 ไมโครลิตร จึงจะให้ค่าที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการวัดการดูดกลืนแสง โดยประโยชน์ของงานวิจัยนี้เมื่อทราบช่วงปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมในการทำการทดลองการอดอาหาร รวมถึงจำนวนแมลงหวี่ที่เหมาะสมในการทดลองการกินอาหารของแมลงหวี่ ทำให้สามารถใช้แมลงหวี่เป็นตัวแทนในการศึกษาผลกระทบของการอดอาหารต่ออายุของมนุษย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณนางสาววรรณนิดา แซ่ตั้ง สำหรับการจัดส่งแมลงหวี่สายพันธุ์ Oregon-R-C และ W1118 จากศูนย์ KYOTO Stock Center (DGRC)

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุมัติทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Min KJ, Flatt T, Kulaots I and Tatar M. Counting calories in Drosophila diet restriction. Exp Gerontol. 2007; 42: 247-51.
2. Duivenvoorde L, van Schothorst E, Bunschoten A and Keijer J. Dietary restriction of mice on a high-fat diet induces substrate efficiency and improves metabolic health. J Mol Endocrinol. 2011; 47: 81-97.
3. Fontana L, Partridge L and Longo VD. Extending healthy life span-from yeast to human. Science 2010; 328: 321-6.
4. Mair W, Dillin A. Aging and survival: The genetics of life span extension by dietary restriction. Annu Rev Biochem. 2008; 77: 727-54.
5. Bass TM, Grandison RC, Wong R, Martinez P, Patridge L and Piper MD. Optimization of dietary restriction protocols in Drosophila. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2007; 62: 1071-81.

6. Emran S, Yang MY, He XL, Zandveld J, Piper MDW. Target of rapamycin signalling mediates the lifespan-extending effects of dietary restriction by essential amino acid alteration. Aging. 2014; 6: 390-8.
7. Ja WW, Carvalho GB, Mak EM, de la Rosa NN, Fang AY and Liong JC. Prandiology of Drosophila and the CAFE assay. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104: 8253-6.
8. Lee KP, Simpson SJ, Clissold FJ, Brooks R, Ballard JW, Taylor P, et al. Lifespan and reproduction in Drosophila: new insights from nutritional geometry. Proc Nalt Acad Sci U S A. 2008; 105: 2498-503.
9. Bronikowski AM and Flatt T. Aging and its demographic measurement. Nature Education Knowledge. 2010; 1: 3.
10. Bronikowski AM, Altmann J, Brockman DK, et al. Aging in the natural world: comparative data reveal similar mortality patterns across primates. Science. 2011; 331: 1325-8.
11. Lenart P, Kuruczova D, Joshi PK and Bienertová-Vašku J. Male mortality rates mirror mortality rates of older females. Sci Rep. 2019; 9: 10589.
12. Pandey UB and Nichols CD. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. Pharmacol Rev. 2011; 63: 411-36.
13. Tolwinski NS. Introduction: Drosophila-a model system for developmental biology. J Dev Biol. 2017; 5:9.
14. Lee BC, Kaya A, Ma S, Kim G, Gerashchenko MV, Yim SH, et al. Methionine restriction extends lifespan of *Drosophila melanogaster* under conditions of low amino-acid status. Nat Commun. 2014; 5: 3592.
15. Skorupa DA, Dervisefendic A, Zwiener J and Pletcher SD. Dietary composition specifies consumption, obesity, and lifespan in *Drosophila melanogaster*. Aging Cell. 2008; 7: 478-90.
16. Lacovaraa S. Malt as a culture medium for Drosophila species. D I S. 1969; 44: 128
17. Bloomington Drosophila stock center. Current Bloomington recipe for Drosophila medium [Online]. 2014. [2016, December 21] Available form: http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/bloomfood.htm
18. Grandison RC, Piper MDW and Partridge L. Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in Drosophila. Nature. 2009; 462: 1061-U1121.
19. Cook RD and Weisberg S. Applied regression including computing and graphics. Wiley. 1999: 281.
20. William WJ, Carvalho GB, Zid BM, Mak EM, Brummel T and Benzer S. Water-and nutrient-dependent effects of dietary restriction on Drosophila lifespan. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 3; 106: 18633-7.

21. Johnson MB and Butterworth FM. Maturation and aging of adult fat body and oenocytes in Drosophila as revealed by light microscope morphometry. J Morphol. 1985; 184: 51-9.
22. Mitchell C, Yeager R, Johnson Z, D'Annunzio S, Vogel K and Werner T. Long-term resistance of *Drosophila melanogaster* to the mushroom toxin alpha-amanitin. PLoS One. 2015; 10: e0127569.
23. Bixler A and Schnee F. The effects of the timing of exposure to cadmium on the oviposition behaviour of *Drosophila melanogaster*. Biometals. 2018; 31: 1075-80.
24. Egli D, Yepiskoposyan H, Selvaraj A, Balamurugan K, Rajaram R, Simons A, et al. A family knockout of all four Drosophila metallothioneins reveals a central role in copper homeostasis and detoxification. Mol Cell Biol. 2006; 26: 2286-96.
25. Pletcher SD, Macdonald SJ, Marquerie R, Certa U, Stearns SC, Goldstein DB, et al. Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. Curr Biol. 2002; 12: 712-23.