

บทนำ

Neurodegenerative disorders หรือความผิดปกติที่เกิดจากการทำลายเซลล์ประสาท ทำให้เกิดโรคทางระบบประสาทส่วนกลางที่เกิดจากการทำลายเซลล์ประสาท (neurodegenerative diseases) ตามมามากมาย เช่น Alzheimer's disease, Parkinson disease, Cerebral ischemia เป็นต้น เมื่อเซลล์ประสาทถูกทำลายทำให้เซลล์ประสาทบริเวณที่ถูกทำลายนั้นไม่สามารถทำหน้าที่ได้เหมือนเดิม ซึ่งปัจจุบันพบว่าประชากรโลกรวมถึงประเทศไทยมีแนวโน้มเป็นโรคเหล่านี้เพิ่มขึ้น ผู้ป่วยไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้ กลายเป็นปัญหาทั้งทางสุขภาพ และเป็นภาระต่อสังคมที่สำคัญ คือ ยังไม่ทราบสาเหตุแท้จริงที่ทำให้เซลล์ประสาทถูกทำลาย ถึงแม้จะมีการศึกษาวิจัยจำนวนมากก็ตาม ปัจจุบันจึงมีความพยายามอย่างมากในการหาแนวทางป้องกัน และการรักษาความผิดปกติที่เกิดจากเซลล์ประสาทถูกทำลาย มีหลายทฤษฎีที่อธิบายถึงสาเหตุการเกิด เช่น การเกิดอนุมูลอิสระจำนวนมาก การเกิดภาวะการอักเสบของเซลล์ประสาท ความบกพร่องของสารสื่อประสาท และความผิดปกติของสารพันธุกรรม เป็นต้น นอกเหนือจากการพยายามหาสาเหตุที่ทำให้เซลล์ประสาทถูกทำลายแล้ว ยังมีการศึกษากลไกภายในเซลล์สัญญาณต่างๆ (signal pathways) ที่ส่งผลทำให้เซลล์ตายไม่เฉพาะแต่เซลล์ประสาทเท่านั้น พบว่าออร์แกเนลล์หนึ่งที่สำคัญในการทำให้เซลล์ตาย รวมถึงกำหนดรูปแบบการตายของเซลล์ คือ ไมโทคอนเดรีย ในการศึกษาวิจัยและพัฒนาหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทนั้น เป้าหมายหนึ่งที่เข้ามาเกี่ยวข้อง คือ การพยายามให้ไมโทคอนเดรียสามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ

ลำพู (*Sonneratia caseolaris* L.) เป็นพืชสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่มีการนำส่วนต่างๆ มาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ตั้งแต่สมัยโบราณ อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาลำพูในด้านสารประกอบสำคัญ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาน้อยมาก จากผลการวิจัยของ Bunyapraphatsara และคณะ, 2003 แสดงให้เห็นว่าส่วนต่างๆ ของลำพูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการศึกษานอกห้อง (*in vitro*) ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัย เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดจากผลลำพูเบื้องต้นด้วยวิธี ABTS radical decolorization assay และ Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay เมื่อเปรียบเทียบกับ trolox และ ascorbic acid พบว่าสารสกัดจากผลลำพูให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาทำให้ลำพูมีความน่าสนใจในการพัฒนาไปใช้ประโยชน์ทางยา ทั้งในด้านการป้องกันและรักษาโรค เพราะอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ มากกว่า 100 ชนิด รวมถึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับการเสื่อมสภาพ และตายของเซลล์ประสาทในโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบประสาท (Valko และคณะ, 2007; Park และคณะ, 2006) ด้วยเหตุนี้การศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากลำพูที่มีต่อการตายของเซลล์ประสาทจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและมีประโยชน์ในทางการแพทย์

ทบทวนวรรณกรรม

ลำพู (*Sonneratia caseolaris* L.) เป็นพืชสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ทางการแพทย์ตั้งแต่สมัยโบราณ ตัวอย่างเช่น ส่วนของใบใช้บำบัดสมกับไข้ใช้พอกรักษาฝีดาษ (จำนง, 2540) หรือนำใบมาโปกกระหม่อมเวลาเลือดดีขึ้น (<http://mangrove.nus.edu.sg/guidebooks/text/1074.htm>) น้ำที่สกัดจากดอกเป็นส่วนผสมในยาขับเลือดในระบบปัสสาวะ (<http://www.school.net.th/library/webcontest2003/100team/dlss020/A2/A2-44.htm>) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาลำพูในด้านสารประกอบสำคัญ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยานั้นมีน้อยมาก จากผลการวิจัยของ Bunyapraphatsara และคณะ, 2003 แสดงให้เห็นว่าส่วนต่างๆ ของลำพูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการศึกษานอกห้อง (*in vitro*) ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัย เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดจากผลลำพูเบื้องต้น

ด้วยวิธี ABTS radical decolorization assay และ Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay เมื่อเปรียบเทียบกับ Trolox และ ascorbic acid พบว่าสารสกัดจากผลลำพูให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ

ความสำคัญของอนุมูลอิสระต่อสุขภาพของมนุษย์นั้น พบว่าอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของโรคต่างๆมากกว่า 100 ชนิด รวมถึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับการเสื่อมสภาพ และตายของเซลล์ประสาทในโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบประสาท (neurodegenerative disorders) (Valko และคณะ, 2007; Park และคณะ, 2006) เช่น การขาดเลือดเฉียบพลันที่สมอง (Cerebral ischemia) (Adibhatla และ Hatcher, 2006; Murakami และคณะ, 1998; Kim และคณะ, 2002) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (Valko และคณะ, 2007; Chauhan และ Chauhan, 2006) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) (Valko และคณะ, González-Polo และคณะ, 2004) และโรคฮันติงตัน (Huntington's disease) (McMurray, 2001) เป็นต้น

Cerebral ischemia หมายถึง ภาวะที่มีปริมาณเลือดไปเลี้ยงสมอง (cerebral blood flow, CBF) บางส่วนลดลง ไม่เพียงพอต่อการทำงานของเซลล์ประสาท อาจเกิดแบบชั่วคราว หรือถาวร (Keller และคณะ, 1998) สาเหตุส่วนใหญ่มาจากความผิดปกติของระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น ภาวะหลอดเลือดมีลิ่มเลือด (thrombosis) ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (arteriosclerosis) ความเป็นกรดในเลือดเพิ่มขึ้น การได้รับบาดเจ็บบริเวณสมอง (Rodrigo และคณะ, 2005; Fagan และคณะ, 1999) เป็นต้น เนื่องจากการลำเลียงสารอาหาร ออกซิเจน อิเล็กโตรไลต์ มาตามกระแสเลือดไปยังเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย ดังนั้นเมื่อสมองขาดเลือดไปเลี้ยงแม้เพียงระยะเวลาสั้นๆ แต่เกิดความเสียหายมากต่อการทำงานของเซลล์ประสาท ส่งผลให้เซลล์นั้นเสื่อมสภาพและตายในที่สุด

ตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายหลังการขาดเลือดเฉียบพลันที่สมอง

1. การทำงานของไมโทคอนเดรียบกพร่อง

หน้าที่สำคัญของไมโทคอนเดรีย คือ การสังเคราะห์พลังงาน (ATP) โดยกระบวนการ Oxidative phosphorylation เกิดขึ้นภายในส่วน matrix ของไมโทคอนเดรีย อาศัยกลูโคสเป็นสารตั้งต้นสำคัญของกระบวนการได้มาซึ่ง ATP (McBride และคณะ, 2006; Knopp และคณะ, 2001) ดังนั้นเมื่อเซลล์ประสาท และ เซลล์เกลีย (neuroglia) ได้รับกลูโคสน้อยลง การสังเคราะห์ ATP และพลังงานภายในเซลล์ลดลง ตามลำดับ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของกระบวนการชีวเคมีภายในเซลล์ (Knopp และคณะ, 2001; Foster และคณะ, 2006)

2. การเปลี่ยนแปลงสมดุลอิออน (ionic gradients)

การรักษาสมดุลอิออนของเซลล์นั้น ต้องใช้พลังงานในการควบคุมแลกเปลี่ยนอิออน เมื่อการสังเคราะห์ ATP ลดลง กลไกการแลกเปลี่ยนอิออนของเซลล์ประสาท และ neuroglia ถูกรบกวน (Martin และคณะ, 1994) กล่าวคือ เพิ่มการนำ Na^+ และ Ca^{2+} เข้าเซลล์ เพิ่มการนำ K^+ ออกจากเซลล์ ทำให้เกิดภาวะ depolarization (Siesjö, 1993) สมดุลอิออนที่ถูกทำลายนี้ ส่งผลให้กระบวนการ electron transport chain ซึ่งเป็นหนึ่งขั้นตอนการสังเคราะห์ ATP เกิดความผิดปกติ

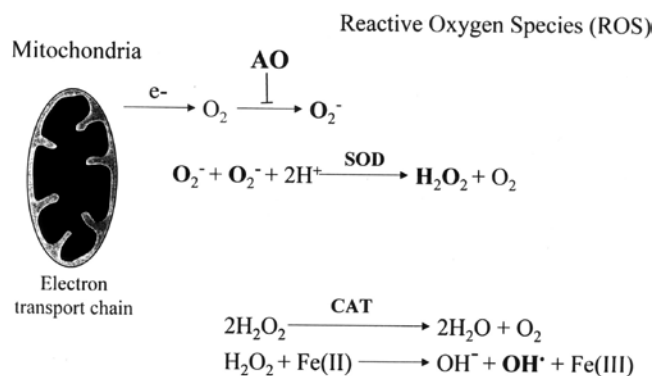
3. อนุมูลอิสระ (Free radicals)

โดยปกติภายในสมองมีกลไกควบคุมสมดุลระหว่าง อนุมูลอิสระ เช่น superoxide (O_2^-), hydroxyl radical ($\text{OH}^\cdot$), peroxynitrite (ONOO^-) และสารต้านอนุมูลอิสระทั้งที่เป็นเอนไซม์ เช่น superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase และไม่ใช่เอนไซม์ เช่น glutathione, uric acid, tocopherol และ ascorbic acid (Valko และคณะ, 2007; Park และคณะ; Blomgren และ Hagberg, 2006)

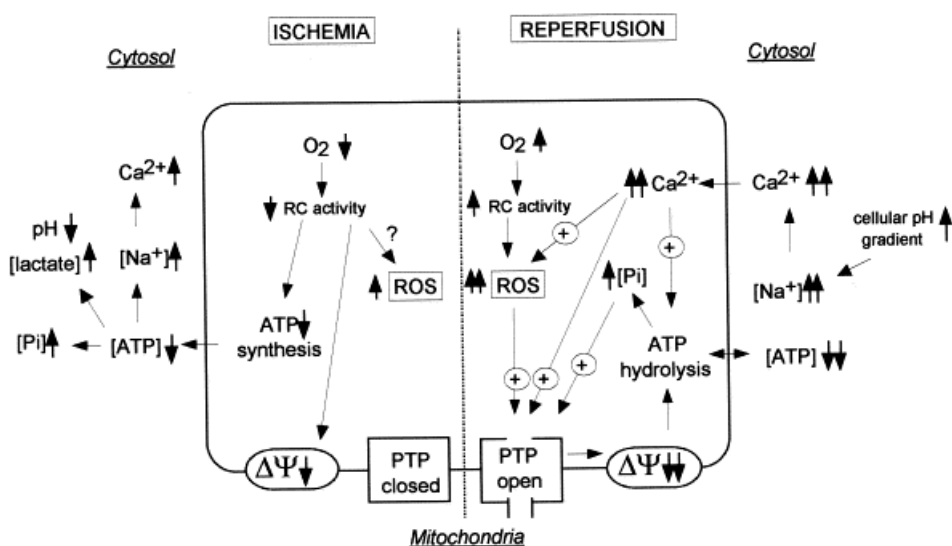
ภายหลังจากการเกิด cerebral ischemia สมดุลนี้เสียไป พบปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะจากไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์หลักที่เกิดอนุมูลอิสระขึ้น (Meany และคณะ, 2006;

Zorov และ Juhaszova, 2006) สอดคล้องกับผลการทดลองใน mutant mice ที่ร่างกายขาด mitochondrial SOD มีการสร้าง O_2^- เพิ่มขึ้น และเพิ่มการทำลายเซลล์ประสาทหลังจาก cerebral ischemia ทั้งแบบชั่วคราว และถาวร (Keller และคณะ, 1998; Rodrigo และคณะ, 2005) ในขณะที่ถ้ามีปริมาณ mitochondrial SOD เพิ่มขึ้นสามารถยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ภายหลังจาก cerebral ischemia แบบชั่วคราว (Keller และคณะ, 1998) ดังที่กล่าวมาข้างต้น อนุมูลอิสระที่มากกว่าระดับปกติ ส่งผลกระทบต่างๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดเซลล์เสื่อมสภาพ และทำลายเซลล์

ประมาณร้อยละ 80-90 ของผู้ป่วย ischemic stroke พบว่ามีพยาธิสภาพจากการที่เซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ (oxidative stress) ซึ่งอนุมูลอิสระหรือเรียกโดยรวมว่า reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์นั้น ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์หลักที่สร้าง ROS จากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (oxidative phosphorylation) ระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ ATP ที่มีอิเล็กตรอนปล่อยออกมาจาก complex I, complex II และ complex III (Jou, 2008) ในภาวะปกติปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์นั้น มีน้อยและไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ อีกทั้งเซลล์ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ ปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นและสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ในสมดุล (Li และคณะ, 2008) (รูปที่ 1) เมื่อเกิดภาวะ ischemia เซลล์ขาดเลือดไปเลี้ยงอย่างสมบูรณ์ ไม่มีออกซิเจน (O_2) ไปยังเซลล์ ส่งผลให้กระบวนการหายใจระดับเซลล์ลดลง และปริมาณ ATP ลดลงอย่างรวดเร็วตามลำดับ จากการที่กระบวนการสังเคราะห์ ATP ถูกยับยั้ง กระบวนการ anaerobic glycolysis จะเกิดขึ้นแบบชั่วคราว เพื่อสมดุลระดับพลังงานภายในเซลล์ ทำให้มีปริมาณ lactate ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการ anaerobic glycolysis เพิ่มขึ้น และเพิ่มความเป็นกรดภายในเซลล์ เมื่อระยะเวลาการเกิด ischemia นานขึ้น จักส่งผลต่อปริมาณไอออนที่เข้าออกภายในเซลล์เช่นเดียวกัน เหตุการณ์ต่างๆ เหล่านี้ล้วนทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ เมื่อเกิด reperfusion กล่าวคือ เลือดกลับมาไหลผ่านบริเวณเซลล์ที่เกิด ischemia อีกครั้ง กระบวนการหายใจระดับเซลล์ กระบวนการสังเคราะห์ ATP กลับมาทำงานเหมือนเดิม อย่างไรก็ตามการที่ออกซิเจนกลับมาเข้าเซลล์อย่างรวดเร็ว นั้น ส่งผลให้เกิดปริมาณ ROS เพิ่มมากขึ้น และเกิด oxidative stress ตามมา (Mortin และคณะ, 2001) (รูปที่ 2) ปริมาณ mitochondrial pyridine nucleotides และ glutathione ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยป้องกันไมโทคอนเดรียถูกทำลายจากภาวะ oxidative stress ลดลง ไมโทคอนเดรียเกิดความผิดปกติขึ้น มีการเปิดออกของ mitochondrial permeability transition pore (PTP) ทำให้เกิดการบวมของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial swelling) สูญเสียความต่างศักย์ของไมโทคอนเดรียเมมเบรน (mitochondrial membrane potential; MMP) และสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย ในที่สุด (Mortin และคณะ, 2001; Choi และคณะ, 2002)

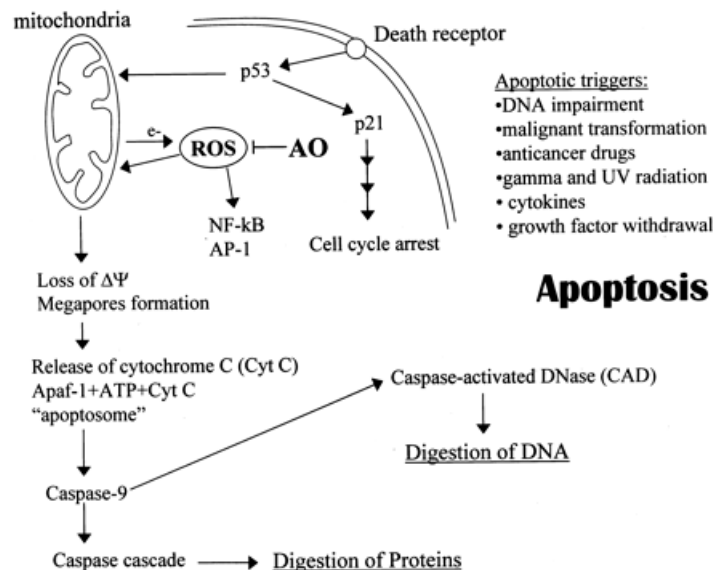


รูปที่ 1 กระบวนการสร้าง ROS จากไมโทคอนเดรีย; superoxides (O_2^-), Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), hydroxyl radicals ($\text{OH}^\bullet$), antioxidants (AO) (Salganik, 2001)



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียในภาวะ ischemia reperfusion. $\Delta\Psi$, mitochondrial membrane potential; PTP, permeability transition pore; RC, respiratory chain; ROS, radical oxygen species (Morin และคณะ, 2001)

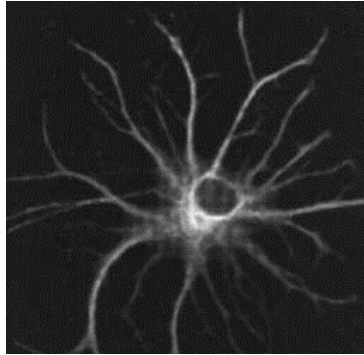
เมื่อเกิดการเปิดของ PTP และสูญเสียความต่างศักย์ของ MMP จะมีการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ทั้งแบบ apoptosis และ necrosis ออกจากไมโทคอนเดรียสู่ไซโตซอล เช่น cytochrome C, Apaf-1, ATP สารเหล่านี้จะไปกระตุ้นสารอื่นๆ ภายในเซลล์ ส่งผลต่อเป็นลำดับขั้น และเกิดการตายของเซลล์ในที่สุด (รูปที่ 3) (Salganik, 2001)



รูปที่ 3 กระบวนการเกิดการตายแบบ apoptosis (Salganik, 2001)

ปัจจุบันมีการวิจัยเรื่อง cerebral ischemia อย่างมาก ทั้งในแง่กลไกการเหนี่ยวนำให้เซลล์ถูกทำลาย และหาวิธีการยับยั้งการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้น ซึ่งไมโทคอนเดรียเป็นอีกเป้าหมายหนึ่งที่ใช้เป็นตัวยับยั้งการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้น ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น ตัวอย่างยาหรือสารที่มีการพัฒนาโดยมุ่งเน้นที่การรักษาสภาพของไมโทคอนเดรีย เช่น Trimetazidine, Ranolazine, Dichloroacetate, Coenzyme Q₁₀ เป็นต้น (Morin และคณะ, 2001) การศึกษาวิจัยหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์เนื่องจากภาวะ ischemia นั้น มีการใช้วิธีการทดลองรูปแบบต่างๆ เพื่อศึกษากลไกการทำลายเซลล์ และผลที่เกิดขึ้นจากการที่เซลล์ถูกทำลายด้วยภาวะ ischemia เพื่อให้ทราบถึงกลไกที่เกิดขึ้นจริงมากที่สุด การวิจัยต้องทดลองในหลายๆ รูปแบบ (ischemic models) เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างในแต่ละวิธี Ischemic models มีทั้งทดลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ได้แก่ vessel occlusions (Di และคณะ, 2006; Wang และคณะ, 2007; Zhou และคณะ, 2006) และการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง หรือ brain slice (*in vitro*) เช่น Ca²⁺-reperfusion injury (Matsuda และคณะ, 1998; Matsuda และคณะ, 2001), oxygen-glucose deprivation (OGD) (Cavaliere และคณะ, 2006; Xu และ Giffard, 1997) เป็นต้น

สำหรับการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้น นอกจากทำการศึกษาผลต่อเซลล์ประสาทโดยตรงแล้ว ยังมีการศึกษาผลที่เกิดต่อ neuroglia เช่นเดียวกัน เนื่องจาก neuroglia โดยเฉพาะ astrocytes ซึ่งพบประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักสมองมนุษย์ (Chen และ Swanson, 2003) มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลภายในสมอง (brain homeostasis) โดยสร้าง trophic factors ควบคุมความเข้มข้นของสารสื่อประสาท และออสโมนาในสมอง กำจัดสารพิษออกจากช่องว่างระหว่างเซลล์ (extracellular space) ภายในระบบประสาทส่วนกลาง (Aschner และคณะ, 2002; Dienel และ Cruz, 2003; Brown และคณะ, 2004) ตลอดจนสร้างสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ATP แก่เซลล์ประสาท เพราะ astrocytes จัดเป็นแหล่งสะสมกลัยโคเจนหลักภายในสมองนั่นเอง (Dienel และ Cruz, 2003; Brown และคณะ, 2004) ในภาวะปกติ astrocyte มีรูปร่างคล้ายดาว (รูปที่ 4) เมื่อเกิดความผิดปกติหรือสูญเสียหน้าที่ รูปร่างของ astrocyte จะเปลี่ยนไปจากเดิม (Montgomery, 1994)



รูปที่ 4 ลักษณะของเซลล์ astrocyte ในภาวะปกติ

(<http://www.daviddarling.info/encyclopedia/A/astrocyte.html>)

การค้นหาลำพที่มีคุณสมบัติยับยั้งขั้นต้นต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับคามผิดปกตินี้จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและมีประโยชน์ทางการแพทย์ โดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพราะอย่างน้อยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งการทำลายเซลล์และปฏิกิริยาต่อเนื่องอันเกิดจากอนุมูลอิสระได้ ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูนที่เตรียมได้จากโครงการที่ 1 ต่อการยับยั้งการตายของเซลล์เพะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย ischemic model 2 วิธี ได้แก่ Ca^{2+} -reperfusion injury และ OGD เพื่อทดสอบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูนมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์เพะเลี้ยง astrocyte จากภาวะการขาดเลือดเฉพาะที่สมองหรือไม่ และอาศัยกลไกใดในการยับยั้ง

คำสำคัญ:

(ภาษาไทย) ลำพูน, Ca^{2+} -reperfusion injury, oxygen-glucose deprivation, แอสโตรไซต์, ปกป้องเซลล์ประสาท

(ภาษาอังกฤษ) *Sonneratia caseolaris*, Ca^{2+} -reperfusion injury, oxygen-glucose deprivation, astrocyte, neuroprotection

วิธีดำเนินการวิจัย

เซลล์

1. เซลล์ Primary rat astrocyte

สารสกัดลำพู

สารสกัดลำพูได้รับจาก รองศาสตราจารย์ ดร.รัชชัย แพชมัด ซึ่งเตรียมสารสกัดโดยการต้มกับน้ำแล้วทำให้แห้งด้วยวิธี spray drying

สารเคมี

1. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) ซื้อจาก Sigma-Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
2. DMSO (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
3. Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Wako Pure Chemical ประเทศ Japan)
4. 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
5. Ethanol (Merck KGa A เมือง Darmstadt ประเทศ Germany)
6. ($\pm$)- α -Tocopherol, approx.95% HPLC (Sigma-Aldrich เมือง Steinheim ประเทศ Germany)
7. Curcumin from *Curcuma longa* crystalline (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
8. Beta-carotenoid (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
9. Dulbecco's modified eagle (DMEM) glucose free medium (Gibco Laboratories ประเทศ America)
10. PBS buffer (NaCl, KCl, Na_2HPO_4) (Ajax fine chem. ประเทศ Australia)
11. EDTA-Trypsin (Sigma Chemical Company ประเทศ America)
12. Fetal calf serum (FBS) (PAA laboratories GmbH ประเทศ Austria)
13. Eagle's minimum essential medium (MEM) (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd. เมือง Tokyo ประเทศ Japan)

เครื่องมือที่ใช้

1. Microplate spectrophotometer (Spectra Count, Perkin Elmer, Massachusetts, USA)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte

วิธีการทดลอง

1. แยกเซลล์ astrocyte ออกจากสมองส่วน cerebral cortices หนูขาว (Wistar rat) อายุ 1-3 วัน
2. เพาะเลี้ยงใน 75 cm³ corning flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Eagle's minimum essential medium ในตู้บ่มระยะเวลา 14 วัน (primary culture) ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน
3. เมื่อได้ระยะเวลาดำเนินการที่กำหนด นำมา subculture ลง 24 well plate (secondary culture) ความหนาแน่น 5×10^4 cells/ well เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 7 วัน เพื่อให้ได้ลักษณะเซลล์แบบ confluent cells

- นำเซลล์ที่ได้จากข้อ 3. ไปทำการทดลองต่างๆ ตามที่กำหนด

2. การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดส่วนต่างๆของลำพู ในภาวะเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ปกติ

วิธีการทดลอง

- เตรียม secondary culture เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte 5×10^4 cells/ well ใน 24 well plate
- เติมสารสกัดส่วนต่างๆ ของลำพูซึ่งสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying จากโครงการย่อย 1 ในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่เตรียมไว้ ความเข้มข้นของสารสกัดส่วนต่างๆ ของลำพูที่ใช้ คือ 0.0001 – 1000 $\mu\text{g/ml}$
- เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมง
- วัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วย MTT assay โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของที่ความยาวคลื่น 550 nm ด้วยเครื่อง microtitre plate reader

3. การศึกษาหาภาวะ (condition) ที่เหมาะสมของ Oxygen glucose-deprivation (OGD) injury

วิธีการทดลอง

- เตรียม secondary culture เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte 5×10^4 cells/ well ใน 24 well plate
- เติมสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 1 nM, 10 μM , 100 μM และ 1000 μM ในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่เตรียมไว้ใน DMEM_0 และ $\text{DMEM}_{5.5}$
- เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมง
- สังเกตลักษณะเซลล์ด้วยกล้อง electron microscope และวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกลุ่มควบคุม

3.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส่วนต่างๆ ของลำพูที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกทำลายโดยวิธี OGD injury

วิธีการทดลอง

- เตรียม secondary culture เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte 5×10^4 cells/ well ใน 24 well plate
- เตรียมสารสกัดส่วนต่างๆของลำพูโดยผ่านการต้มและ spray drying จากโครงการย่อย 1 ความเข้มข้น 0.0001 $\mu\text{g/ml}$, 0.001 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ใน DMEM_0 และ $\text{DMEM}_{5.5}$
- แทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ด้วย DMEM_0 หรือ $\text{DMEM}_{5.5}$
- เติมสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 1 nM ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง
- เติมสารสกัดส่วนต่างๆของลำพูจากข้อ 2 ลงไปตามความเข้มข้นที่กำหนด
- เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมง
- สังเกตลักษณะเซลล์ด้วยกล้อง electron microscope และวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วย MTT assay เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกลุ่มควบคุม

3.2 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของลำพูที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกทำลายโดยวิธี OGD injury ตามระยะเวลาที่กำหนด (time-course)

วิธีการทดลอง

1. เตรียม secondary culture เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte 5×10^4 cells/ well ใน 24 well plate
2. เตรียมสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของลำพูโดยผ่านการต้มและ spray drying จากโครงการย่อย 1 ความเข้มข้น 0.0001 $\mu\text{g/ml}$, 0.001 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ใน DMEM₀ และ DMEM_{5.5}
3. แทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ (medium) ในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ด้วย DMEM₀ หรือ DMEM_{5.5}
4. เติมสารละลาย H₂O₂ ความเข้มข้น 1 nM ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง
5. เติมสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของลำพูจากข้อ 2 ลงไปตามความเข้มข้นที่กำหนด
6. เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 4, 6 และ 8 ชั่วโมง
7. สังเกตลักษณะเซลล์ด้วยกล้อง electron microscope และวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วย MTT assay เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกลุ่มควบคุม

4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของลำพูที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกทำลายโดยวิธี Ca²⁺ - reperfusion injury

วิธีการทดลอง

1. เตรียม secondary culture เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte 5×10^4 cells/ well ใน 24 well plate
2. เตรียมสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของลำพูโดยผ่านการต้มและ spray drying จากโครงการย่อย 1 ด้วย Ca²⁺ free Earle's solution ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ คือ 0.0001 $\mu\text{g/ml}$, 0.001 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.01 $\mu\text{g/ml}$
3. แทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ (medium) ในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ด้วย Ca²⁺ free Earle's solution
4. เติมสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของลำพูจากข้อ 2 ลงไปตามความเข้มข้นที่กำหนด
5. เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 1 ชั่วโมง
6. แทนที่ Ca²⁺ free Earle's solution ในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ด้วย Earle's solution และเติมน้ำสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของลำพูจากข้อ 2 ลงไปตามความเข้มข้นที่กำหนด
7. เพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 24 ชั่วโมง
8. สังเกตลักษณะเซลล์ด้วยกล้อง electron microscope และวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วย MTT assay เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกลุ่มควบคุม

5. การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

เพื่อดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่การทดลองต่างๆ เมื่อสิ้นสุดแต่ละการทดลอง แทนที่สารละลายที่ทำการทดลองด้วยสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ทิ้งไว้ในตู้บ่มระยะเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นแทนที่ด้วยสารละลาย DMSO เพื่อละลายผลึกสีของ MTT (MTT formazan) ที่เกิดขึ้น และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ด้วยเครื่อง microtitre plate reader

6. การศึกษาหาปริมาณ ROS โดย 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA); DCF assay

เพื่อดูปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ในการทดลองต่างๆ เมื่อสิ้นสุดแต่ละการทดลอง เติมสารละลาย DCF-DA 10 μM ทิ้งไว้ในตู้บ่ม 30 นาที และนำไปวัดค่าการเรืองแสง (fluorescence) ที่ความยาวคลื่น excitation 485 nm, emission 538 nm ด้วยเครื่อง microtitre plate reader ตลอดการทดสอบด้วยวิธีนี้ทำในที่มืด เพื่อให้ค่าการเรืองแสงที่เกิดขึ้นนั้น ให้ค่าที่ถูกต้องมากที่สุด

DCF-DA เป็นสารที่ไม่เรืองแสง เมื่อผ่านเข้าสู่เซลล์ และถูกเอนไซม์ esterase ตัด acetyl group ออก ได้สาร 2',7'-dichlorofluorescein ซึ่งไม่เรืองแสงเช่นเดียวกัน ถ้าภายในเซลล์มี ROS อยู่ 2',7'-dichlorofluorescein จะทำปฏิกิริยากับ ROS ได้สารเรืองแสง DCF อยู่ภายในเซลล์

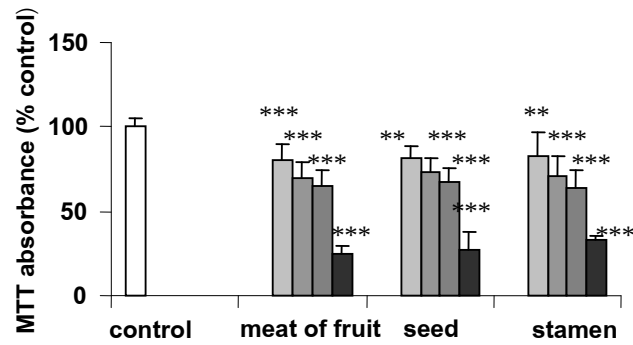
7. การคำนวณทางสถิติ (Statistical analysis)

ข้อมูลที่แสดงในการวิจัยครั้งนี้ หมายถึง ค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และวิเคราะห์หาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้การคำนวณ ANOVA และ Tukey's multiple comparison test มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ p value < 0.05

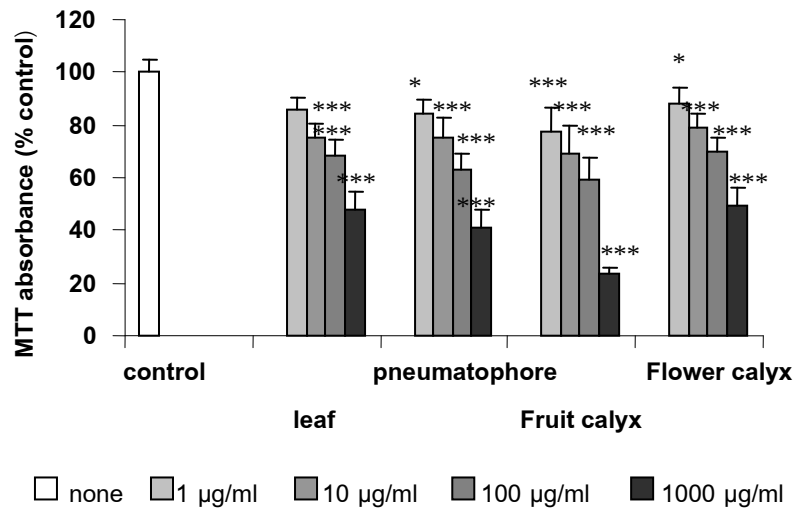
ผลการวิจัยและวิจารณ์

การวิจัยในครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่สกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying สามารถยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte หรือไม่ โดยเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte นั้นถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเลียนแบบ ischemia ด้วย 2 วิธี คือ OGD model และ Ca^{2+} -reperfusion model ซึ่งเป็นรูปแบบการทดลองที่ใช้ในการศึกษาถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นในภาวะ cerebral ischemia ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น (Matsuda และคณะ, 1998; Matsuda และคณะ, 2001; Cavaliere และคณะ, 2006; Xu และ Giffard, 1997) ทั้งนี้ ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte นั้น ปัจจุบันยังไม่พบรายงาน ดังนั้นในเบื้องต้นผู้วิจัยจึงทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ไม่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte เปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างเมื่อสังเกตด้วยกล้อง electron microscope และไม่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูความเข้มข้น 1-1000 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte เปลี่ยนแปลงรูปร่าง และทำให้เซลล์รอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ความเข้มข้น 0.01 – 0.0001 $\mu\text{g/ml}$ ไม่ทำให้ เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte เปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างจากเดิมที่มีลักษณะคล้ายดาว (Montgomery, 1994) และไม่มีผลต่อการตายอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 6) ยกเว้นสารสกัดจากส่วนเมล็ดลำพูที่ความเข้มข้น 0.001 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ตายอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่เลือกใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือ 0.01 – 0.0001 $\mu\text{g/ml}$

A)

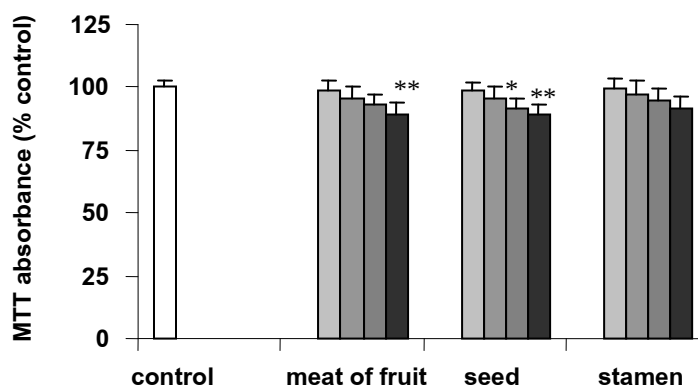


B)

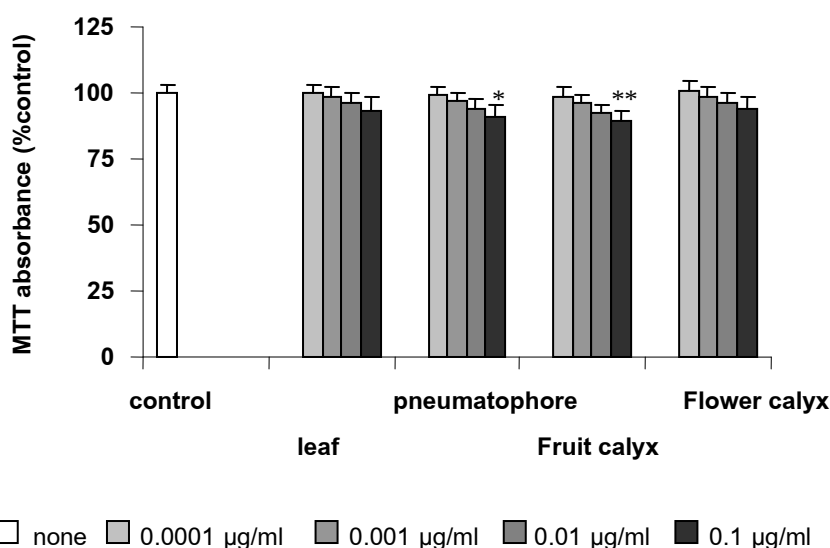


รูปที่ 5 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying (A) ผล เมล็ด เกสร (B) ใบ หน่อ ปีกผล กลีบดอก ความเข้มข้น 1–100 µg/ml ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ในสภาวะปกติ (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

A)



B)



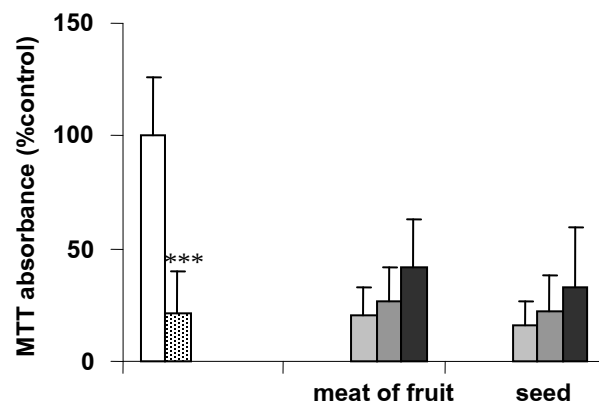
□ none ■ 0.0001 µg/ml ■ 0.001 µg/ml ■ 0.01 µg/ml ■ 0.1 µg/ml

รูปที่ 6 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying (A) ผล เมล็ด เกสร (B) ใบ หน่อ ปีกผล กลีบดอก ความเข้มข้น 0.0001–0.1 µg/ml ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ในสภาวะปกติ (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

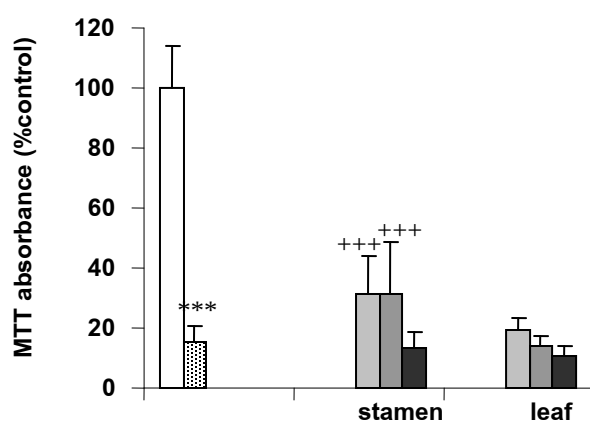
เนื่องจากรูปแบบการทดลอง OGD นั้นสามารถทำได้หลายวิธี โดยการเติมสารที่มีคุณสมบัติทำให้การหายใจระดับเซลล์ถูกยับยั้ง (oxygen deprivation) เช่น carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP) (Tonkikh และ Carlen, 2009), 3-Morpholinosydnonimine (SIN-1) (Shin และคณะ, 2001) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากน้ำตาล (glucose deprivation) ในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้สาร H_2O_2 เป็นตัวทำให้การหายใจระดับเซลล์ถูกยับยั้ง ดังนั้นในขั้นแรกของการทดลอง H_2O_2 ความเข้มข้นต่างๆ ถูกนำมาทดลองกับเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ในสภาวะปกติ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ผลการทดลองพบว่า H_2O_2 ความเข้มข้น 1 nM ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ในสภาวะปราศจากน้ำตาล (DMEM₀) มีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด ในขณะที่ในสภาวะที่มีน้ำตาล

(DMEM_{5.5}) นั้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพู ได้แก่ ผล เมล็ด เกสร ใบ หน่อ ปีกผล และกลีบดอกต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย OGD model 24 ชั่วโมง พบว่าเฉพาะสารสกัดส่วนเกสรลำพูความเข้มข้น 0.0001 $\mu\text{g/ml}$ และ 0.001 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้นที่ยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ดังแสดงในรูปที่ 7 อย่างไรก็ตามการยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้น เป็นเพียงการยับยั้งบางส่วน เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ยังคงมีการตายอยู่ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่มีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม และตายจากการที่เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ตายในภาวะขาดน้ำตาลและออกซิเจนนั้น เนื่องจากเซลล์เพาะเลี้ยงเกิด oxidative stress (Jou, 2008; Morin และ Hauet, 2001) การสังเคราะห์ ROS เพิ่มขึ้น ไมโทคอนเดรียถูกทำลาย สูญเสียสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Choi และคณะ, 2002) กลไกที่สารสกัดส่วนเกสรลำพูยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte บางส่วนนั้น อาจเกิดจากฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อไมโทคอนเดรียหรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งนั่นทวน และคณะ ได้รายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนต่างๆ ของลำพูไว้ (Bunyapraphatsara และคณะ, 2003) สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงระดับไมโทคอนเดรีย นั้น ยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป โดยทั่วไปการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วยวิธีต่างๆ นั้นมีลำดับขั้นตอน (cascade) ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการตายแบบ apoptosis หรือ necrosis ก็ตาม การเปลี่ยนแปลงหนึ่งที่เกิดขึ้น คือ การหลั่งสารต่างๆ จากไมโทคอนเดรียสู่ไซโตซอล เช่น apoptosis inducing factors, cytochrome C ไปกระตุ้นสัญญาณ (signal pathway) ต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น caspase cascade (Salganik, 2001) และทำให้เซลล์ตายในที่สุด เพื่อศึกษาว่าการเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ตายด้วยวิธี OGD ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงนั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียภายหลังจากถูกเหนี่ยวนำนานเท่าไร และในช่วงระยะเวลาที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูมีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวหรือไม่ ผู้วิจัยจึงได้ทดลองเหนี่ยวนำเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ด้วย OGD model ระยะเวลา 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าการเหนี่ยวนำระยะเวลาทั้ง 4 และ 6 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 8, 9) สำหรับระยะเวลา 8 ชั่วโมงนั้นอยู่ในระหว่างการทดลอง ถึงแม้ว่าภายหลังจากการเหนี่ยวนำด้วยวิธี OGD 4 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง จะไม่พบการตายของเซลล์เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ก็ได้หมายความว่าไม่มีความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้นภายในเซลล์ รวมถึงจากการทดสอบด้วย MTT assay นั้นยังไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่ามีการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียเกิดขึ้นหรือไม่ ซึ่งต้องใช้วิธีการทดสอบอื่นๆ เพิ่มเติม

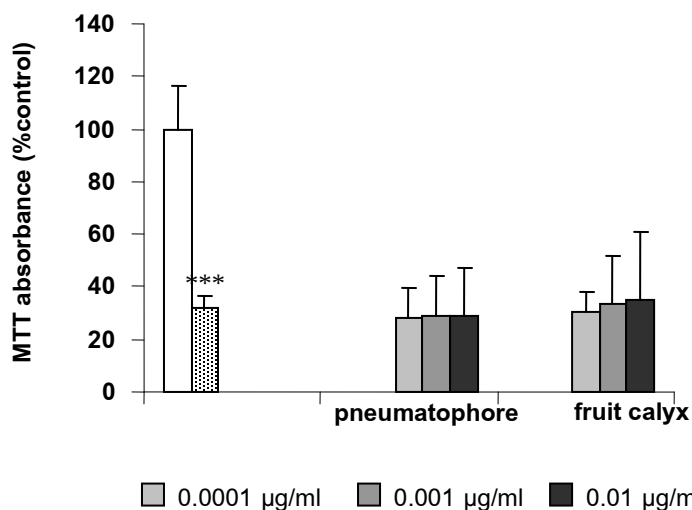
A)



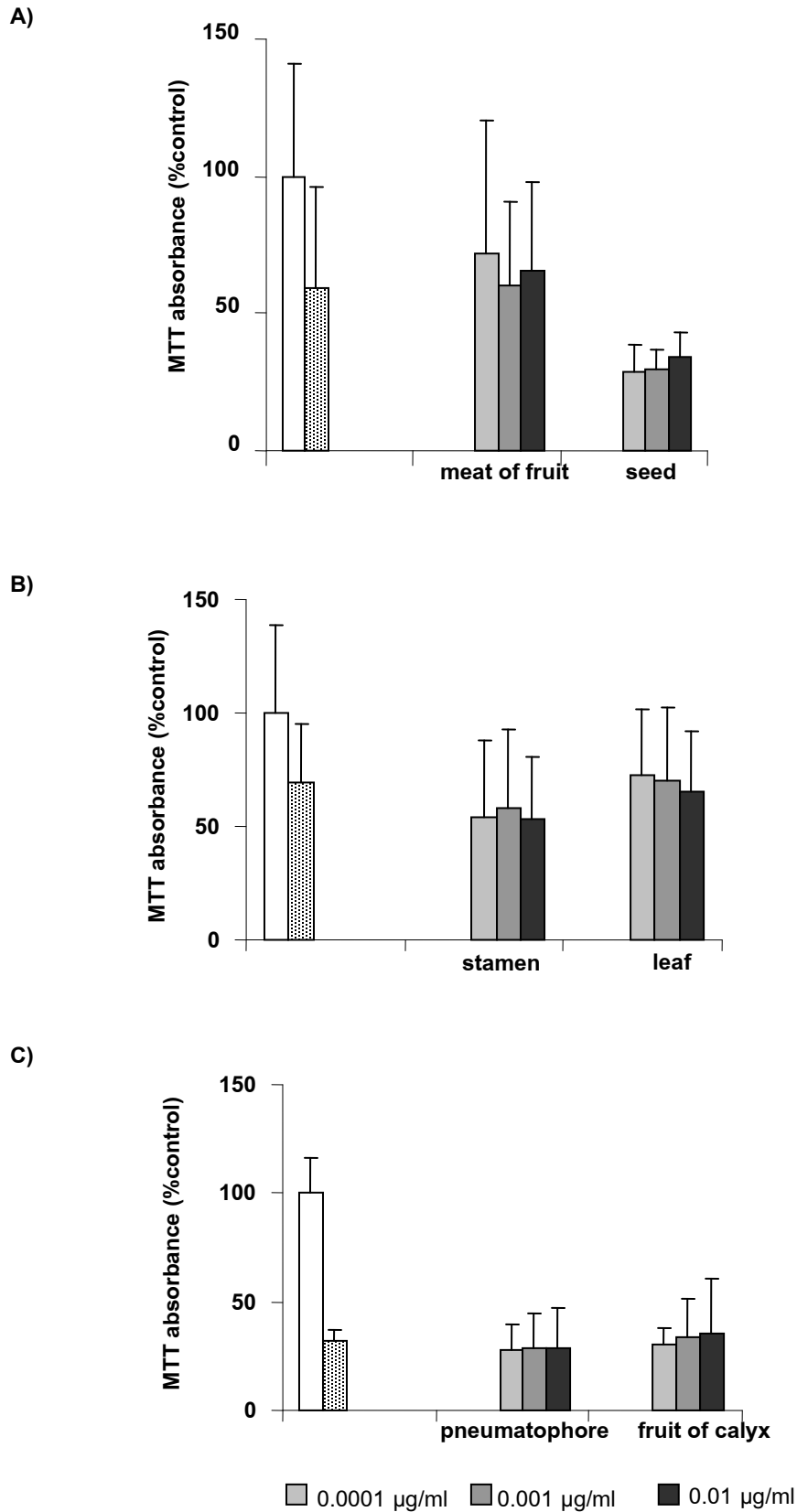
B)



C)

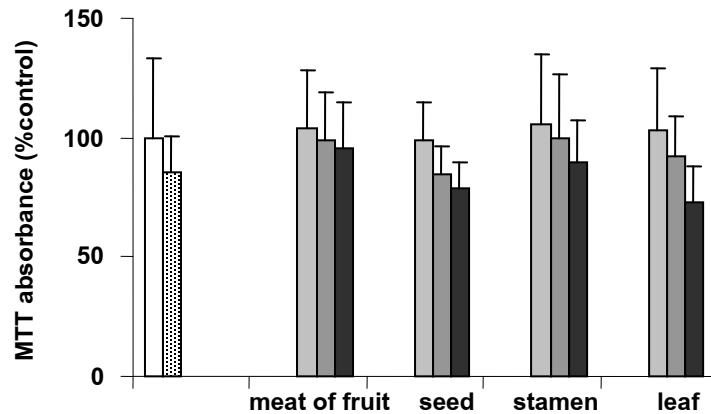


รูปที่ 7 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying (A) ผล เมล็ด (B) เกสร ใบ (C) หน่อ ปีกผล ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย OGD model 24 ชั่วโมง เมื่อ □ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในสภาวะปกติ ▨ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในภาวะ OGD (***) $p < 0.001$ v.s non treated astrocyte, +++ $p < 0.001$ v.s 0 µg/ml extraction in OGD treated astrocyte)

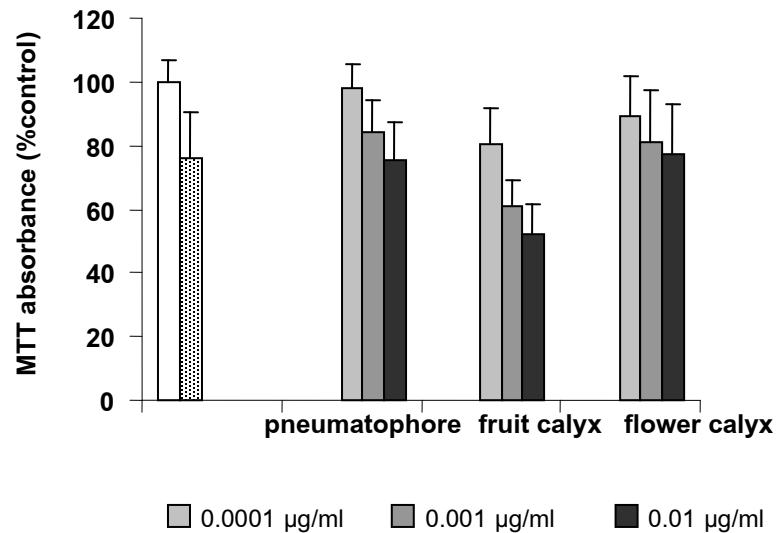


รูปที่ 8 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying (A) ผล เมล็ด (B) เกสร ใบ (C) หน่อ ปีกผล ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย OGD model 4 ชั่วโมง เมื่อ □ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในสภาวะปกติ ▨ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในสภาวะ OGD

A)



B)

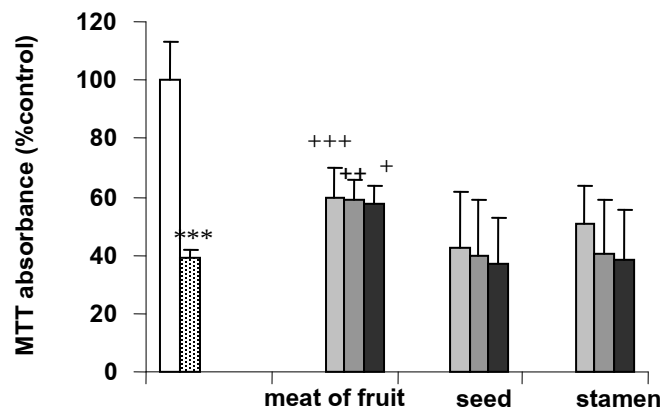


รูปที่ 9 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพู ที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying (A) ผล เมล็ด เกสร ใบ (B) หน่อ ปีกผล กลีบดอก ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย OGD model 6 ชั่วโมง เมื่อ □ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในสภาวะปกติ ■ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในภาวะ OGD

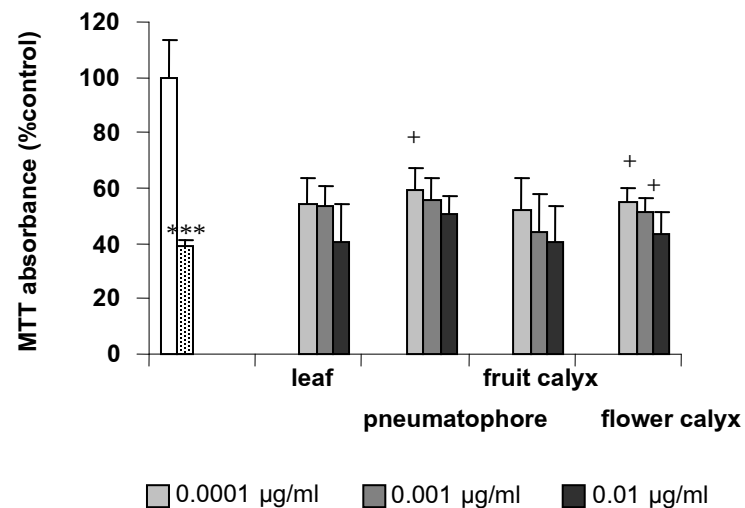
ผลการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion model นั้น พบว่าสารสกัดจากส่วนผลลำพู หน่อลำพู และกลีบดอกลำพูมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte บางส่วนอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 10) การเหนี่ยวนำเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย Ca^{2+} -reperfusion model นั้น ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress เช่นเดียวกับการเหนี่ยวนำด้วยวิธี OGD ดังนั้นการเหนี่ยวนำเซลล์ให้บาดเจ็บด้วยวิธีนี้ย่อมทำให้เกิดความผิดปกติของไมโทคอนเดรียเช่นเดียวกัน (Salganik, 2001) เมื่อทราบสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่มีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์แล้ว นำสารสกัดเหล่านั้นมาทำการทดสอบดูการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ศึกษา คือ การวัดปริมาณ ROS ที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่ม

ควบคุม โดยวัดค่าการเรืองแสงของสาร DCF ซึ่งจะแปรผันกับปริมาณ ROS ภายในเซลล์ทั้งหมด (Liu และคณะ, 2006) จากผลการทดลองพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณ ROS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion เมื่อเติมสารสกัดจากส่วนผลลำพู หน่อลำพู และกลีบดอกลำพูความเข้มข้นต่างๆ ทำให้ปริมาณ ROS ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ไม่มีสารสกัดจากลำพู (รูปที่ 11) แสดงว่ากลไกหนึ่งที่สารสกัดส่วนผลลำพู หน่อลำพู และกลีบดอกลำพูมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte อาจเกิดจากฤทธิ์ที่มีต่อไมโทคอนเดรีย โดยส่วนหนึ่งมีผลทำให้ปริมาณ ROS ลดลง เพื่อเป็นการยืนยันกลไกการออกฤทธิ์นี้ควรทำการทดสอบด้วยวิธีการอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น วัดการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential วัดปริมาณ ATP เป็นต้น (Foster และคณะ, 2006) ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential โดยดูจากค่าการเรืองแสงของ Rhodamine 123 (Rh123) ซึ่งมีค่าการเรืองแสงลดลงเมื่อ mitochondrial membrane potential เกิดภาวะ depolarization เมื่อทำการทดสอบด้วย Rh123 นั้น เซลล์ในภาวะปกติจะนำสาร Rh123 เข้าสู่ไมโทคอนเดรียเกิดการเรืองแสงขึ้น เมื่อเกิดภาวะ depolarization ของ mitochondrial membrane สาร Rh123 จะเคลื่อนที่ออกจากไมโทคอนเดรียออกมาสู่ภายในไซโทพลาซึม ส่งผลให้การเรืองแสงของสารนั้นลดลง จากผลการทดลองพบว่า เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion ระยะเวลา 24 ชั่วโมง mitochondrial membrane เกิด depolarization ความเข้มของสารเรืองแสง Rh123 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion เมื่อเติมสารสกัดจากส่วนผลลำพู หน่อลำพู และกลีบดอกลำพูความเข้มข้นต่างๆ มีฤทธิ์ยับยั้งการ depolarize ของ mitochondrial membrane เซลล์เพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.001$) เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ไม่มีสารสกัดจากลำพู (รูปที่ 12) ผลการทดลองที่ได้นี้ ช่วยในการยืนยันว่ากลไกที่เกี่ยวข้องของสารสกัดจากส่วนผลลำพู หน่อลำพู และกลีบดอกลำพูในการยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ในภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้บาดเจ็บด้วย Ca^{2+} -reperfusion นั้น เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำลายไมโทคอนเดรีย

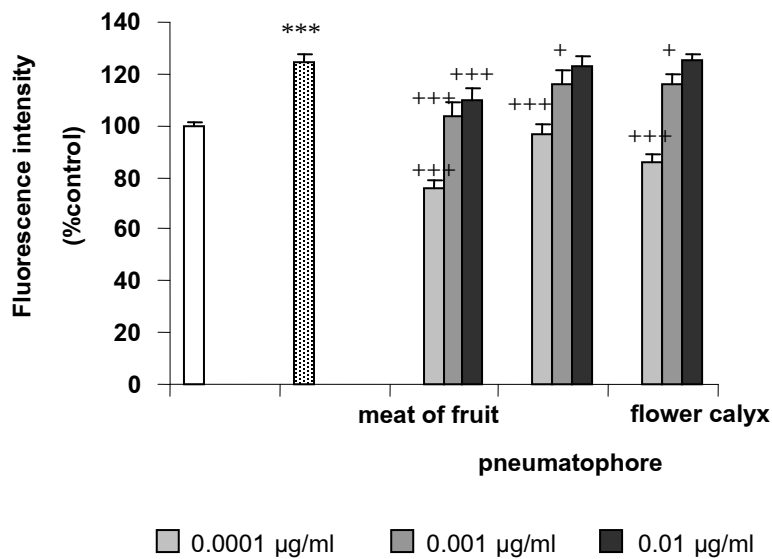
A)



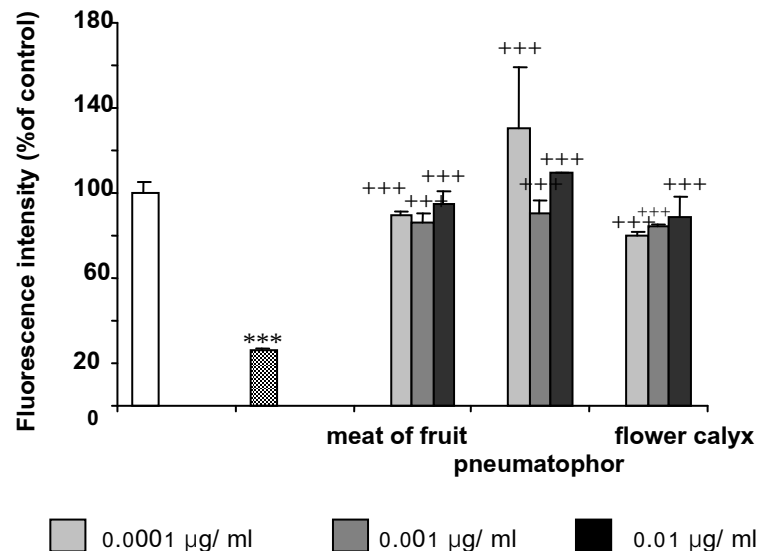
B)



รูปที่ 10 ผลของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ถูกสกัดโดยผ่านการต้มและ spray drying (A) ผล เมล็ด เกสร (B) ใบ หน่อ ปีกผล ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion model เมื่อ □ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในสภาวะปกติ ▨ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในภาวะ Ca^{2+} -reperfusion (***) $p < 0.001$ v.s non treated astrocyte, +++ $p < 0.001$, ++ $p < 0.01$, + $p < 0.05$ v.s 0 µg/ml extraction in Ca^{2+} -reperfusion treated astrocyte)



รูปที่ 11 ผลของสารสกัดที่เตรียมจากการต้มและ spray drying จากส่วนผลลำพู หน่อลำพู และกลีบดอกลำพูความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อปริมาณ reactive oxygen species ในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion model เมื่อ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในสภาวะปกติ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในภาวะ Ca^{2+} -reperfusion ($***p < 0.001$ v.s non treated astrocyte, $+++p < 0.001$, $+p < 0.05$ v.s 0 µg/ml extraction in Ca^{2+} -reperfusion treated astrocyte)



รูปที่ 12 ผลของสารสกัดที่เตรียมจากการต้มและ spray drying จากส่วนผลลำพู หน่อลำพู และกลีบดอกลำพูความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อ mitochondrial membrane potential ในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion model เมื่อ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในสภาวะปกติ แสดงถึงกลุ่มควบคุมในภาวะ Ca^{2+} -reperfusion ($***p < 0.001$ v.s non treated astrocyte, $+++p < 0.001$ v.s 0 µg/ml extraction in Ca^{2+} -reperfusion treated astrocyte)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดส่วนต่างๆ ของลำพู โดยเตรียมจากการการต้มและ spray drying ที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ในภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำให้บาดเจ็บด้วย 2 วิธี ที่เลียนแบบรูปแบบการทำให้เกิดภาวะขาดเลือดในสมอง คือ Ca^{2+} -reperfusion model และ OGD model นั้น สามารถสรุปได้ ดังนี้

1. สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูความเข้มข้นมากกว่า $1 \mu\text{g/ml}$ ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ในภาวะปกติเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ

สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่ความเข้มข้นมากกว่า $1 \mu\text{g/ml}$ นั้น เมื่อบ่มกับเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ในภาวะปกตินาน 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ดังกล่าวมีอัตราการรอดชีวิตลดลง เหตุผลหนึ่งอาจเกิดได้จากสารที่เป็นองค์ประกอบบางชนิดในสารสกัดจากลำพูที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น สาร luteolin ซึ่งเป็นสารหนึ่งที่พบในสารสกัดลำพู มีฤทธิ์ลดการอยู่รอดของเซลล์ เช่น human epitheloid cancer cells (Attoub และคณะ, 2011), rat H4IIE cells (Michels และคณะ, 2005) และ rat lung fibroblast (Zhang และคณะ, 2009) ซึ่งการแสดงออกซึ่งความเป็นพิษแปรผันตามความเข้มข้นของสาร (dose-dependent) การเกิดพิษของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ครั้งนี้ สอดคล้องกับโครงการวิจัย ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทางชีวภาพและการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากลำพู ที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษของสารสกัดลำพูต่อเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ

2. สารสกัดที่เตรียมจากการต้มและ spray drying ส่วนเกสรลำพูมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย OGD model อย่างมีนัยสำคัญ
3. สารสกัดที่เตรียมจากการต้มและ spray drying ส่วนหน่อลำพู ผลลำพู และกลีบดอกลำพูมีฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Ca^{2+} -reperfusion model อย่างมีนัยสำคัญ โดยกลไกการออกฤทธิ์หนึ่งเกิดจากการลดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ และยับยั้งการ depolarization ของ mitochondrial membrane

จากทั้ง 2 วิธีที่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte เกิดการบาดเจ็บและตายนั้น จักเห็นได้ว่าฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูแต่ละส่วน จะให้ผลยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่แตกต่างกัน โดยวิธี OGD เฉพาะส่วนเกสรของลำพูเท่านั้นที่ให้ผลยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์นั้น ทางผู้วิจัยได้ทำการทดลองในด้านการลดปริมาณ ROS ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากวิธี OGD แต่ผลการทดลองที่ได้มีค่าการเบี่ยงเบนในแต่ละครั้งค่อนข้างสูง ส่งผลให้ผลการทดลองที่ออกมาไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน ซึ่งต่างจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ตายด้วยวิธี Ca^{2+} -reperfusion วิธีการนี้สามารถแสดงให้เห็นชัดเจนว่า กลไกการยับยั้งการตายของเซลล์จากสารสกัดลำพูนั้น ส่วนหนึ่งเกิดจากการยับยั้งการสังเคราะห์ ROS ที่เพิ่มขึ้นจากวิธี Ca^{2+} -reperfusion ซึ่งเป็นผลจากการที่สารสกัดจากส่วนต่างๆ ของลำพูไปยับยั้งการเกิด depolarization ของ mitochondrial membrane เฉพาะสารสกัดจากส่วนหน่อลำพู ผลลำพู และกลีบดอกลำพูเท่านั้นที่ให้ผลในการยับยั้งการตายของเซลล์ด้วยวิธี Ca^{2+} -reperfusion การที่สารสกัดส่วนต่างๆ ของลำพูให้ผลยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte แตกต่างกันนั้น ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากองค์ประกอบ

ทางเคมีของสารสกัดแต่ละส่วนนั้นมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน นอกจากนี้ทั้ง 2 รูปแบบการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีกลไกที่แตกต่างกัน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าปริมาณสารในแต่ละส่วนของสารสกัดลำพูนนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งกลไกการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ เป็นกลไกหนึ่งที่มีบทบาทในการยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง astrocyte ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยวิธี Ca^{2+} -reperfusion ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับการทำงานของไมโทคอนเดรีย ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น เพื่อยืนยันแนวคิดดังกล่าว ควรทำการทดลองเกี่ยวกับการทำงานของไมโทคอนเดรียเพิ่มเติมนอกเหนือจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondria membrane potential เช่น การวัดประสิทธิภาพเอนไซม์ใน mitochondrial respiratory chain เป็นต้น

บรรณานุกรม

- จำนง ทองประเสริฐ ราชบัณฑิต จดหมายข่าวราชบัณฑิตยสถาน ปีที่ 7 ฉบับที่ 74, กรกฎาคม 2540
ลำพู [online]. [cited 2005 July 7]. Available
from <http://www.school.net.th/library/webcontest2003/100team/dlss020/A2/A2-44.htm>
- Adibhatla RM, Hatcher JF. Phospholipase A₂, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. **Free Radic Biol Med**. 2006; 40(3): 376-87
- Aschner M, Sonnewald U, Tan KH. Astrocyte modulation of neurotoxic injury. **Brain Pathol**. 2002; 12(4): 475-81
- Attoub S, Hassan A, Vanhoecke B. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epitheloid cancer cells. **Eur J Pharmacol**. 2011; 651:18-25.
- Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia–ischemia in the developing brain. **Free Radic Biol Med**. 2006; 40(3): 388-97
- Brown AM, Tekok SB, Ransom BR. Energy transfer from astrocytes to axon: the role of CNS glycogen. **Neurochem Int**. 2004; 45(4): 529-36
- Bunyapraphatsara N, Jutiviboonsuk A, Sornlek P. Pharmacological studies of plants in the Mangrove forest. **Thai J Phytopharmacy**. 2003; 10(2): 1-12
- Cavaliere F, Dinkel K, Reymann K. The subventricular zone releases factors which can be protective in oxygen/glucose deprivation-induced cortical damage: An organotypic study. **Exp Neurol**. 2006; 201(1): 66-74
- Chauhan V, Chauhan A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Pathophysiology**. 2006; 13(3): 195-208
- Chen Y, Swanson RA. The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. **J Neurochem**. 2003; 84(6): 1332–9
- Choi JJ, Kong MY, Lee SJ, Kim HC, Ko KH, Kim WK. Cyclopirox prevents peroxynitrite toxicity in astrocytes by maintaining their mitochondrial function: a novel mechanism for cytoprotection by cyclopirox. **Neuropharmacology**. 2002; 43(3): 408-17
- Di Filippo M, Picconi B, Costa C, Bagetta V, Tantucci M, Parnetti L, Calabresi P. Pathways of neurodegeneration and experimental models of basal ganglia disorders: Downstream effects of mitochondrial inhibition. **Eur J Pharmacol**. 2006; 545(1): 65-72
- Dienel GA, Cruz NF. Neighborly interaction of metabolically-activated astrocytes in vivo. **Neurochem Int**. 2003; 43(4-5): 339-54
- Fagan CS, Bowes PM, Berri AS, Zivin AJ. Combination treatment for acute ischemic stroke: A ray of hope?. **J Stroke Cerebrovasc Dis**. 1999; 8(6): 359-67
- Foster KA, Galeffi F, Gerich JF, Turner AD, Müller M. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. **Prog Neurobiol**. 2006; 79(3): 136-71

- González-Polo AR, Soler G, Rodríguezmartín A, Morán MJ, Fuentes MJ. Protection against MPP⁺ neurotoxicity in cerebellar granule cells by antioxidants. **Cell Biol Int**. 2004; 28(5): 373-80
- Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by cyclosporine A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat heart. **J Mol Cell Cardiol**. 1993; 25(12): 1461-69
- Jou MJ. Pathophysiological and pharmacological implications of mitochondria-targeted reactive oxygen species generation in astrocytes. **Adv Drug Deliv Rev**. 2008; 60(13-14): 1512-26
- Kalaria RN. Cerebral vessels in ageing and Alzheimer's disease. **Pharmacol Ther**. 1996; 72(3): 193–214
- Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St. Clai DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. **J Neurosci**. 1998; 18(2): 687-97
- Kim GW, Kondo T, Noshita N, Chan PH. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal/ cerebral in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. **Stroke**. 2002; 33(3): 809-15
- Knopp A, Thierfelder S, Doeppner B, Benndorf K. Mitochondria are the main ATP source for a cytosolic pool controlling the activity of ATP-sensitive K⁺ channels in mouse cardiac myocytes. **Cardiovasc Res**. 2001; 52(2): 236-45
- Li Y, Bao Y, Jiang B, Wang Z, Liu Y, Zhang C, An L. Catalpol protects primary cultured astrocytes from in vitro ischemia-induced damage. **Int J Dev Neurosci**. 2008; 26(3-4): 309-17
- Liu J, He QJ, Zou W, Wang HX, Bao YM, Liu YX, An LJ. Catalpol increases hippocampal neuroplasticity and up-regulates PKC and BDNF in the aged rats. **Brain Res**. 2006; 1123(1): 68-79
- Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?. **Trends Neurosci**. 1994; 17(6): 251–57
- Matsuda T, Takuma K, Asano S, Kishida Y, Nakamura H, Mori K, Maeda S, Baba A. Involvement of calcineurin in Ca²⁺ paradox-like injury of cultured rat astrocyte. **J. Neurochem**. 1998; 70(5): 2004-11
- Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, Kishida Y, Kawasaki Y, Sakaue M, Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, Ota T, Hamano-Takahashi A, Onishi M, Tanaka Y, Kameo K, Baba A. SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. **J Pharmacol Exp Ther**. 2001; 298(1): 249-56
- McBride MH, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: More than just a powerhouse. **Curr Biol**. 2006; 16(14): R551-60
- McMurray TC. Huntington's disease: new hope for therapeutics. **Trends Neurosci**. 2001; 24(11 Suppl): S32-8
- Meany DL, Poe GB, Navratil M, Moraes TC, Arriaga AE. Superoxide released into the mitochondrial matrix. **Free Radic Biol Med**. 2006; 41(6): 950-59
- Michels G, Watjen W, Niering P. Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. **Toxicology**. 2005; 206:337-48.
- Montgomery DL. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. **Vet Pathol**. 1994; 31(2): 145-67

- Morin D, Hauet T, Spedding M, Tillement J. Mitochondria as target for antiischemic drugs. **Adv Drug Deliv Rev.** 2001; 49(1-2): 151-74
- Murakami K, Kondo T, Kawase M, Li Y, Sato S, Chen SF, Chan PH. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. **J Neurosci.** 1998; 18(1): 205-13
- Ng PK, Sivasothi N. Flowering plants. [online]. [cited 2005 July 16]; Available from <http://mangrove.nus.edu.sg/guidebooks/text/1074.htm>.
- Park ES, Gao X, Chung JM, Chung K. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. **Neurosci Lett.** 2006; 391(3): 108-11
- Rodrigo J, Fernández AP, Serrano J, Peinado MA, Martínez A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. **Free Radic Biol Med.** 2005; 39(1): 26-50
- Salganik RI. The Benefits and Hazards of Antioxidants: Controlling Apoptosis and Other Protective Mechanisms in Cancer Patients and the Human Population. **J Am Coll of Nutr.** 2001; 20(5 Suppl): 464S-472S
- Siesjö BK. A new perspective on ischemic brain damage?. **Prog. Brain Res.** 1993; 96: 1–9
- Shin CY, Choi JW, Jang ES, Ryu JH, Kim WK, Kim HC, Ko KH. Glucocorticoids exacerbate peroxynitrite mediated potentiation of glucose deprivation-induced death of rat primary astrocytes. **Brain Res.** 2001; 93(1-2): 163-71
- The internet encyclopedia of science [online]. [cited 2010 May 5]; Available from <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/A/astrocyte.html>
- Tonkikh AA, Carlen PL. Impaired presynaptic cytosolic and mitochondrial calcium dynamics in aged compared to young adult hippocampal CA1 synapses ameliorated by calcium chelation. **Neuroscience.** 2009; 259(4): 1300-08
- Uchino H, Elmer E, Uchino K, Lindvall O, Siesjö BK. Cyclosporin A dramatically ameliorates CA1 hippocampal damage following transient forebrain ischemia in the rat. **Acta Physiol Scand.** 1995; 155(4): 469-71
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin TDM, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.** 2007; 39(1): 44-84
- Wang J, Zhang Z, Hu Y, Hau X, Cui Q, Zang Y, Wang C. SEA0400, a novel $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger inhibitor, reduces calcium overload induced by ischemia and reperfusion in mouse ventricular myocytes. **Physiol Res.** 2007; 56(1): 17-23
- Xu L, Giffard RG. HSP70 protects murine astrocytes from glucose deprivation injury. **Neurosci Lett.** 1997; 224(1): 9-12
- Zhang GM, Gong GQ, Li LL. Effects of Luteolin on the proliferation of rat lung fibroblasts. **Chinese J Nat med.** 2009; 7:297-300.
- Zhou Y, Fang SH, Ye YL, Chu LS, Zhang WP, Wang ML, Wei EQ. Caffeic acid ameliorates early and delayed brain injuries after focal cerebral ischemia in rats. **Acta Pharmacol Sin.** 2006; 27(9):1103-10

Zorov BD, Juhaszova M, Sollott JS. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review.
Biochim Biophys Acta. 2006; 1757(5-6): 509-17



Certification of Approval for the Care and Use of Laboratory Animals at Silpakorn University

by Ethics Committee for the Use of Laboratory Animals
Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

Title of Project Neuroprotective activity and mechanism of the extractions
from *Sonneratia caseolaris*

Principal Investigator Patamawan Phuagphong, Ph.D.

Protocol Number 0001/2009

Name of Faculty Faculty of Pharmacy, Silpakorn University.

The aforementioned protocol have been reviewed and approved by Ethics
Committee for the Use of Laboratory Animals, Faculty of Pharmacy,
Silpakorn University.

Date of Approval 19 November 2010

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pornsak Sriamornsak'.

(Pornsak Sriamornsak, Ph.D.)

Chairman

Ethics Committee for the Use of Laboratory Animals
Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jurairat Nunthanid'.

(Jurairat Nunthanid, Ph.D.)

Dean

Faculty of Pharmacy,
Silpakorn University

รูปที่ 13 ใบรับรองการอนุญาตให้เลี้ยงและใช้สัตว์ที่มีชีวิตเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ที่มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติและผลงานของผู้วิจัย

นางสาวปัทมวรรณ เพือก่อง

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย). นางสาวปัทมวรรณ เพือก่อง
(ภาษาอังกฤษ). Miss. Patamawan Phuagphong

2. วัน เดือน ปีเกิด 27 สิงหาคม 2516

3. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานและที่อยู่ติดต่อได้

สถานที่ทำงาน ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม 73000

โทรศัพท์: 034 253910-7 ต่อ 24269 โทรสาร: 034 255801

Email: patamawan@su.ac.th

ที่อยู่ปัจจุบัน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม 73000

โทรศัพท์: 034 253910-7 ต่อ 24269 โทรสาร: 034 255801

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาเอก Ph.D. in Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Japan, 2547

ปริญญาโท M.Pharm in Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Japan, 2544

ปริญญาตรี เภสัชศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2539

6. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ดำเนินการทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท

The role of mitochondrial function on cultured rat astrocytic death. ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2544

- ระดับปริญญาเอก

The role of T-588 on cultured rat astrocytic death. ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2547

7. สาขาวิชาที่มีเชี่ยวชาญ

สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ในด้าน

- Molecular neuropharmacology

8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

8.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่มีต่อหอยเชอรี่
สนับสนุนจากคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีที่ดำเนินการเสร็จ 2549 (หัวหน้าโครงการ)
- การเปรียบเทียบวิธีล้างผักในการลดปริมาณยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต
สนับสนุนจากคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีที่ดำเนินการเสร็จ 2550 (หัวหน้าโครงการ)
- ฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (ผู้ร่วมโครงการ) สนับสนุนจากคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2551
- ความเป็นพิษของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด (หัวหน้าโครงการ)
สนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2551
- ฤทธิ์ของสารสกัดพืชในสกุล *Citrus* ที่มีความเป็นพิษต่อหอยเชอรี่และไรทะเล (หัวหน้าโครงการ)
สนับสนุนจากคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2552

8.2 Publications

- **Phuagphong P**, Fukushima T, Hatanaka R, Tanaka K, Baba A, Matsuda T. T-588, a cognitive enhancer, protects against sodium nitroprusside-induced toxicity in cultured astrocytes. *J. Pharmacol. Sci.* **95**:135-138 (2004)
- Takuma K, **Phuagphong P**, Lee E, Enomoto R, Mori K, Baba A, Matsuda T. The nitric oxide donor NOC12 protects cultured astrocytes against apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Jpn. J. Pharmacol.* **89**:64-71 (2002)
- Takuma K, **Phuagphong P**, Lee E, Mori K, Baba A, Matsuda T. Anti-apoptotic effect of cGMP in cultured astrocytes: inhibition by cGMP-dependent protein kinase of mitochondrial permeable transition pore. *J. Biol. Chem.* **276**:48093-48099 (2001)

8.3 Presentations

- The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASRM) and The 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit) 16-18 December 2010, Fukuoka, Japan. "Sonneratia caseolaris Linn extraction prevent Ca^{2+} -reperfusion induced astrocytic cell injury". **Phuagphong P**, Punpae S, Phaechamud T.
- The 23rd Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress (FAPA). November 5-8, 2010. In Taipei, Taiwan. "Toxic Effects of Citrus Extracts on Pomacea Canaliculata". **Patamawan Phuagphong**, Nudchanart Kitcharoen, Srisombat Nawanopparatsakul
- 4th Asian Association of Schools of Pharmacy 9th Malaysian Pharmaceutical Society Pharmacy Scientific Conference 2009 (AASP-MPSPSC 2009) 10-13 June 2009, Penang, Malaysia. "Skin Irritation of the Extraction from Fruit Hull of Mangosteen". **Patamawan Phuagphong**, Chatchai Chinpaisal, Srisombat Nawanopparatsakul
- 14th Congress on Alternatives to Animal Testing-Linz 2007, 11th Annual Meeting of MEGAT-Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing 28-30 September 2007.

- Linz, Austria. "Fabrication and validation of corneal holders for porcine corneal opacity and permeability assay". Asavapichayont P, Ukong S, **Phuagphong P**, Meksuriyen D.
- การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7 11-13 ตุลาคม 2550. ชลบุรี. "Eye irritation testing using porcine cornea: Fabrication and validation of corneal holders". Asavapichayont P, Yukong S, **Phuagphong P**, Meksuriyen D.
 - International Workshop on Medicinal and Aromatic Plant. January 15-18, 2007, In Chiang Mai, Thailand. "Neuroprotective Effect of Thai Herbal Food Extracts Possessing High Antioxidant Activity" **Patamawan Phuagphong**, Chawarit Sittisombut
 - The 21st Congress of Federation of Asian Pharmaceutical Associations (FAPA). November 18-21, 2006, In Yokohama, Japan "Neuroprotective activity of some medical herbs from Thailand" **Patamawan Phuagphong**, Tosak Intharapairoj, Tawatchai Phaechamud
 - Abstracts of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP) Asia Pacific Regional Meeting. Neuro-Psychopharmacology: Challenging for Better Health. March 14-17, 2006 "Role of *Areca catechu* L., in Ca^{2+} reperfusion-induced cell death of cultured rat astrocyte" **P. Phuagphong**, T. Phaechamud, S. Keokitichai
 - International Symposium of Pharmacology, 23 March – 25 March 2001, In Chiba, Japan. "Effect of T-588 in mitochondrial astrocytic death" **P. Phuagphong**, D. Wakamatsu, R. Kosaki, T. Matsuda, A. Baba.
 - 6th Glia Research Meeting, 8 December 2001, In Osaka, Japan. "The role of mitochondrial membrane potential and astrocytic death" **P. Phuagphong**, R. Nakao, R. Kosaki, T. Matsuda, A. Baba.
 - 53th Japan Pharmaceutical Symposium, 1 November 2003, In Osaka, Japan. "Alteration of mitochondria in apoptotic and necrotic astrocytic death" **P. Phuagphong**, A. Kasai, H. Hashimoto, T. Matsuda, A. Baba.

8.4 Invited Speaker

- ไม่มี

8.5 หนังสือ

- ไม่มี

8.6 บทความทางวิชาการ

- ปัทมวรรณ เฝือกผ่อง, ต่อศักดิ์ อินทรไพโรจน์ 2549 New antidiabetic agents: Dipeptidyl peptidase IV inhibitor. วารสารยา ปีที่ 6 ฉบับที่ 95 หน้า 7-13.
- ต่อศักดิ์ อินทรไพโรจน์, ปัทมวรรณ เฝือกผ่อง 2549 Histamine and receptors: from H_1R to H_4R antagonists. วารสารยา ปีที่ 6 ฉบับที่ 94 หน้า 5-15.
- ต่อศักดิ์ อินทรไพโรจน์, ปัทมวรรณ เฝือกผ่อง 2549 บทบาทของสารยับยั้งโคเลสเตอรอลเอสเทอร์ทรานสเฟอร์โปรตีนต่อระดับ HDL. ไทยโภชนาการ ปีที่ 3 ฉบับที่ 2 หน้า 1-13.

8.7 รางวัลที่เคยได้รับ (เกี่ยวกับงานวิจัย)

- ไม่มี

8.8 งานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

- ไม่มี

8.9 งานวิจัยที่กำลังทำ

- ฤทธิ์ของ asiaticoside ในการปกป้องเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ตายด้วยเบต้าอะไมลอยด์ (หัวหน้าโครงการ – รศ.ดร.นันทิยา)
- ความเป็นพิษของสารสกัดพืชสมุนไพรและการนำไปใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชชีวภาพ (หัวหน้าโครงการ)
- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิกจากส่วนผลของพืชสกุล *Citrus* (ผู้ร่วมโครงการ)
- ฤทธิ์และกลไกของสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของวัชพืชแทน (ผู้ร่วมโครงการ)
- ฤทธิ์เบื้องต้นของดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก็กฮวย) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแทน (ผู้ร่วมโครงการ)