ชื่อโครงการวิจัย ผลของเลือดจระเข้ต่อการงอกของเซลล์ประสาท และปกป้องการทำลายเซลล์จากอนุมูลอิสระ

Effect of Crocodile Blood on Neurite Outgrowth and Neuroprotection from Free Radical

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี 6 เดือน ตั้งแต่ 28 กค. 54 ถึง 27 มค. 56

ชื่อผู้วิจัย

นางพิมลวรรณ อัคคภิญญา (ทัพยุทธพิจารณ์) ภม. (เภสัชพฤกษศาตร์)
ศูนย์การแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทรศัพท์ 02 9269749

นางสาวสุวพร แซ่ลิ้ม วท.บ. (ชีววิทยา)
หน่วยวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทรศัพท์ 02 9269830

นางวนัสยา สุอังคะวาทิน วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)
หน่วยวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทรศัพท์ 02 9269830

นายวิน เชยชมศรี ปร. ด. (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร).
ภาควิชาสัตวทิยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3264

นางอรุณพร อิฐรัตน์ Ph. D. (Pharmacognosy)
ศูนย์การแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทรศัพท์ 02 9269749

.....

บทคัดย่อ

ปัญหา เลือดจระเข้เป็นสมุนไพรจากสัตว์ใช้เป็นยาเดี่ยวหรือเป็นตัวยาในตำรับยาเพื่อบำรุงร่างกาย หรือรักษาโรคเรื้อรัง ในเลือดจระเข้มีสารสำคัญได้แก่ Insulin like growth factor -1 หรือ IGF-1 (จินดาวรรณ, 2553) สารนี้มีผลปกป้องเซลล์ประสาทจากการตายในสภาวะอาหารเพาะเลี้ยงไม่สมบูรณ์ (Gil-Ad I, 1999) นอกจากการปกป้องเซลล์ประสาทแล้วการงอกใยประสาทเพิ่มขึ้นนับเป็นอีกกลไกหนึ่งของการวิจัยยาบำรุงประสาทและช่วยเพิ่มความจำ แต่ยังไม่ปรากฏรายงานวิจัยเกี่ยวกับผลของเลือดจระเข้ต่อการงอกใยประสาท ซึ่งสามารถตรวจนับเซลล์ที่งอกใยประสาท (Yamazaki M, 2005)และวัดปริมาณโปรตีน mitogen-activated protein kinase (MAPK หรือ MEK-1) ที่เซลล์สร้างขึ้นในขบวนการเปลี่ยนรูปร่างเซลล์และการงอกใยประสาท (Liu JH, 2003; Ebrahimi A, 2012)

วัตถุประสงค์ ศึกษาผลของซีรั่มจากเลือดจระเข้ต่อการงอกใยประสาทในเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 และหาปริมาณโปรตีน MEK1

วิธีการทดลอง ใช้ซีรั่มจากเลือดจระเข้ 10 ตัว เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว ทำแห้งด้วยวิธี freezed dried เพาะเลี้ยงเซลล์ PC 12 ศึกษาความเป็นพิษจากซีรั่มเลือดจระเข้ และศึกษาขนาดซีรั่มที่ผลต่อการงอกใยประสาทโดยนับเป็นร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีใยประสาทงอก (Das KP, 2004; Yamazaki M, 2005) และวัดปริมาณโปรตีน MEK-1 โดยวิธี Enzyme Immunoassay

ผลการทดลอง ซีรั่มแห้งเลือดจระเข้ขนาดความเข้มข้นที่มีผลให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (IC_{50}) เป็น 25.26 mg /ml ซีรั่มแห้งขนาดความเข้มข้น 4 mg/ml มีผลเพิ่มปริมาณเซลล์มากขึ้น และมีผลให้เซลล์งอกใยประสาทได้ร้อยละ 9.04 ± 3.42 ในจำนวนนับ100เซลล์ ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ให้ nerve growth factor (NGF) 2 ng/ml แต่น้อยกว่ากลุ่มที่ให้ NGF 50 ng/ml ซึ่งมีค่าร้อยละการงอกใยประสาทเป็น 3.05± 1.32 และ 14.81 ± 3.79 ตามลำดับ(นัยสำคัญ p 0.5) กลุ่มเซลล์ที่มีการงอกใยประสาทนี้และกลุ่มที่ให้ NGF 50 ng/ml มีการสร้างโปรตีน MEK-1 เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 204 ± 28.91 และ 253.26 ± 34.2 ต่างจากกลุ่มควบคุม (นัยสำคัญ p 0.5) ส่วนซีรั่มเลือดจระเข้ขนาด 2, 0.4 mg/ml ไม่มีผลต่อการงอกใยประสาทและไม่เพิ่มปริมาณโปรตีน MEK1

ข้อเสนอแนะ จากการทดลองสรุปได้ว่าการใช้ซีรั่มเลือดจระเข้เข้มข้นสัมผัสเซลล์โดยตรงมีผลให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงตายได้ มีค่า IC_{50} เป็น 25.26 mg/ml แต่เมื่อเจือจางซีรั่มในขนาดความเข้มข้น 4 mg/ml มีผลให้เซลล์แบ่งตัวได้เพิ่มขึ้นและงอกใยประสาทได้ ซึ่งน่าจะเป็นผลจากสาร IGF-1 ในซีรั่มร่วมกับสารสำคัญอื่น ดังนั้นในการใช้ซีรั่มเลือดจระเข้จึงควรระวังเกี่ยวกับขนาดใช้ เนื่องจากขนาดซีรั่มที่ให้ผลกับขนาดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทไม่ต่างกันมาก และในกรณีใช้เป็นยาบำรุงซึ่งต้องใช้ระยะยาว น่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเรื่องความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังหรือติดตามผลการใช้ในคนปกติตามขั้นตอนการวิจัยขั้นคลินิก

คำสำคัญ : ซีรัมเลือดจระเข้ การงอกของเซลล์ประสาท

ABSTACT

Rational Background. It was known that crocodile blood could be used as single drug or as combined recipe in traditional medicine for its activity as analeptic or nootropic drug in chronic disease therapy. Insulin like growth factor -1 (IGF-1), found in crocodile serum, was reported to protect neuronal cell dead when cultured in serum free medium (Gil-Ad I, 1999). The assessments of neurite outgrowth and mitogen activated protein kinase (MAPK) or MEK-1 are striking mechanisms in nootropic drugs research. No evidence revealed the neuritic effect of crocodile serum in neurone cell.

Aims. To study of the effect of crocodile serum on neurite outgrowth and the amount of MEK-1 in PC12 culture.

Method. Serum obtained from 10 crocodiles, 5 males and 5 females, were freezed-dried and experimented. PC12 was cultured for studying cytotoxic effect of the dried serum. The percentage of cell bearing neurite outgrowth were counted in totally of 100 cells (Das KP, 2004; Yamazaki M, 2005). The amount of MEK-1, produced while cell proliferated and differentiated, was evaluated by the enzyme immunoassay method.

Results. The IC_{50} of crocodile serum was 25.26 mg/ml. Serum group, at the concentration of 4 mg/ml, potentiated proliferation and neurite outgrowth with the percentage of 9.04 ± 3.42 more than the negative control group with NGF 2 ng/ml (3.05± 1.32%) but lesser than the positive control group with NGF 50 ng/ml (14.81 ± 3.79%) ($p < 0.05$). The amount of MEK-1 was also increase in the treatment of 4 mg/ml group as 204 ± 28.91% and the positive control group as 253.26 ± 34.2 % of negative control group ($p<0.05$). The diluted serum of 2 and 0.4 mg/ml had no effect on neurite outgrowth and MEK-1 synthesis.

Discussion and Conclusions. The crocodile dried serum when directly contacted to neuronal cell was toxic at the IC_{50} of 25.26 mg/ml. Diluted dried serum at concentration of 4 mg/ml potentiated neurite outgrowth which could be proved by the increase of MEK-1. This effect might due to the IGF-1 and other active substances contained in crocodile blood. As the therapeutic window of crocodile serum was rather narrow, so for nootropic use, the repeated small doses of serum should be suggested. Furthermore, sub-chronic toxicity and clinical trial should be followed up.

Keyword : Crocodile serum, Neuritogenesis, Neuroprotection

บทนำ

ปัจจุบันโรคสมองเสื่อมเป็นปัญหาที่สำคัญของผู้สูงอายุซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น อุบัติการณ์ของโรคนี้มีสูงถึง 1:20 รายของประชากรโลกที่มีอายุเกิน 65 ปี และในคนที่มีอายุเกิน 80 ปีจะมีอัตราสูงขึ้นถึง 1:4 ราย โดยที่ในการดูแลผู้ป่วยเหล่านี้จะต้องมีการใช้งบประมาณเป็นจำนวนมาก การวิจัยค้นคว้ายาเพื่อรักษาภาวะหรือชะลอการเกิดโรคดังกล่าวจึงมีความสำคัญไม่เพียงแต่เพื่อรักษาผู้ป่วยเท่านั้น แต่เป็นการส่งเสริมให้คนปกติสามารถคงสภาวะปกติหรือเพิ่มความจำหรือชะลอการเกิดโรคได้

เป็นที่ทราบกันว่าในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมมีพยาธิสภาพของเนื้อสมองที่สำคัญ คือ การสะสมของ amyloid plaque ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทผ่านกระบวนการทาง oxidative stress และ inflammation ส่งผลให้เซลล์ประสาทตาย เมื่อเซลล์ประสาทลดลง ก็ทำให้เกิดการขาดแคลนสื่อประสาทต่างๆ ทำให้เกิดความผิดปกติของ cognitive function เกิดอาการทางพฤติกรรมและจิตใจต่อมา (จุฑามณี 2546) ส่วนกลไกอื่นที่เกี่ยวข้องกับการปกป้องเซลล์ประสาทที่มีการวิจัย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านแคลเซี่ยม (Ca2+ - blocking), ฤทธิ์ต้าน cholinesterase และต้าน NMDA (**Bachurin S, 2001**) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Vornov JJ, 1998) ลด mitochondria membrane potential (MMP) (Shin Y, 2002) และการเพิ่มการงอกของใยประสาท

ปัจจัยที่มีผลเพิ่มการงอกของเซลล์ประสาทที่มีการวิจัยได้แก่ สาร Nitric oxide (Yamazaki M, 2006; Yamazaki M, 2005) การกระตุ้นผ่าน protein kinase C และ extracellular signal-related kinase (ERK)(Hawes JJ, 2006) สาร nerve growth factor (NGF) และ สาร Insulin-like growth factor (IGF-I) ซึ่งนอกจากมีผลให้เซลล์ประสาทงอกแล้วยังเพิ่ม cells differentiation และเพิ่มอายุเซลล์หรือ cell viability ด้วย (Gil-Ad I, 1999) เกี่ยวกับการงอกใยประสาทสามารถวัดความยาวของใยประสาทที่งอกโดยตรง (Kim JH , 2007) นับจำนวนเซลล์ที่มีการงอกเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต ดู cell proliperation วัดความหนาแน่นของใยประสาท (Teng KK ,1993) วัดปริมาณสารโปรตีนเช่น protein kinase มีรายงานวิจัยพบว่า การเติม NGF ขนาด 2 µg/L มีผลให้เซลล์เพาะเลี้ยง PC12เปลี่ยนรูปร่าง งอกใยประสาท ปรากฏให้เห็นได้ใน 48 ชั่วโมง ทั้งนี้มีกลไกเกี่ยวข้องกับโปรตีน mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Liu JH, 2003) ทั้งวิถีทางตรงและทางอ้อม (Seger R, 1995) วิถีสัญญาณ MARK (MAPK signaling pathway) มีความเกี่ยวข้องกับการความยืนหยุ่น(plasticity)ของเซลล์เช่นการเปลี่ยนรูปร่างเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการตายแบบ apoptosis (Ebrahimi A, 2012; Miranda, 2002; Lin CC, 2002) การกระตุ้นวิถี MAPK/ERK **(** extracellular signal regulated kinase) และ Akt หรือ PKB (Protein kinase B) มีผลปกป้องเซลล์ประสาทได้ อีกทั้งพบว่าในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมชนิด

Alzheimer มี ER and TrkA (tyrosine kinase A) มากกว่าคนปกติ (Hwang SL, 2012) นอกจากสาร NGF แล้วมีสาร IGF-I ที่ทีผลต่อการงอกใยประสาทโดยมีรายงานวิจัยการเลี้ยงเซลล์ PC12 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ขาดซีรัมมีผลให้เซลล์ตายได้ 20–27% ในเวลา 24-48 ชั่วโมง แต่เมื่อให้สาร IGF-I ขนาด 0.5–2.0 μg/ml ด้วยจะมีผลยับยั้งการตายได้ (Gil-Ad I, 1999)

ดังกล่าวแล้วว่าสาร nerve growth factor (NGF) มีบทบาทสำคัญต่อการมีชีวิตและการเจริญของเซลล์ประสาท (Deshmukh M,1997) แต่สาร NGF นี้ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคระบบประสาทและสมองได้เนื่องจากมีค่าครึ่งชีวิตสั้น และไม่สามารถผ่าน blood brain barrier ได้ จึงมีความจำเป็นต้องหาสารอื่นๆที่มีผล neurotrophic activity เพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป

ตามกรรมวิธีทางการแพทย์แผนไทย เลือดจระเข้จัดเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งจากสัตว์ที่นำมาใช้เป็นยาเดี่ยวหรือเป็นตัวยาในตำรับยา มีสรรพคุณเกี่ยวกับการเพิ่มภูมิต้านทาน บำรุงร่างกาย ตำรับยาที่มีรายงานการใช้รักษา เช่นตำรับยามะเร็ง ตำรายาบำรุงร่างกาย ส่วนสรรพคุณทางวิทยาศาสตร์ยังไม่มีงานวิจัยเป็นที่เด่นชัด จากการแยกส่วนประกอบจากเลือดจระเข้พบว่ามี insulin like growth factor-I (IGF-I) อยู่ในส่วนพลาสมาของเลือดจระเข้ตัวเมียในช่วงอายุที่ไม่มีการผสมพันธุ์ (Crain DA,1995; Guillette LJ , 1996) สำหรับจระเข้พันธุ์ไทยพบว่าในน้ำเลือด(ซีรัมสด)ของจระเข้อายุ 2-5 ปี มีปริมาณซีรัม IGF-1 ในเพศผู้ (n=13) เท่ากับ 64.51±5.42 ng/ml และเพศเมีย(n=10) เท่ากับ 70.92±4.18 ng/ml และในซีรัมแห้ง (freezed dried) มีปริมาณมีปริมาณ IGF -1 ในเพศผู้มี 61.80 ng/ml (n =13)และในเพศเมียเป็น 76.30 ng/ml (จินดาวรรณ, 2553) ดังกล่าวแล้วว่า สาร IGF-I นี้มีผลโดยตรงต่อการงอกของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของเพื่อศึกษาผลของซีรัมจากเลือดจระเข้ ต่อการงอกเซลล์ประสาท ซึ่งตรวจวัดโดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีการงอกยาวขึ้นและตรวจวัดปริมาณโปรตีน MEK 1

วิธีดำเนินการวิจัย

<u>เซลล์และสารเคมี</u>

Cell line PC12 cells สั่งซื้อจาก American Type Culture Collection (USA) นำเข้าโดยบริษัท ANH Scientific marketing จำกัด 96 well-Plate และ 24well-plate ใช้ชนิดเคลือบผิวด้วยสาร collagen (poly D- Lysine / หรือ collagen type I)ซื้อจากบริษัท ANH Scientific marketing จำกัด อาหารเลี้ยงเซลล์สั่งซื้อจากบริษัทกิบไทย จำกัด ประกอบด้วย Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) (high glucose formula), heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), heat-inactivated Horse serum (HS) และ 1% penicillin-streptomycin สารอื่นๆได้แก่ MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

bromide, DMSO, tocopherol, Bovine serum albumin (BSA), phosphate-buffered saline(PBS) , Nerve growth factor (NGF) ของ Sigma Aldrich สั่งซื้อจากบริษัท SM Chemical จำกัด ชุดตรวจวัดโปรตีน MEK 1 ของ Enzo Life Sciences สั่งซื้อจากบริษัท SM Chemical จำกัด

การดำเนินการทดลอง

1. <u>การเตรียมซีรัมจากเลือดจระเข้</u> จัดเตรียมโดยโครงการวิจัยหลัก กล่าวโดยย่อคือ เก็บตัวอย่างซีรัมจระเข้พันธุ์ไทย *(Crocodylus siamensis)* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง อายุ 2-5 ปี จำนวน 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว) เก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้สำลีชุบ 70%แอลกอฮอล์ เช็ดบริเวณส่วนหัวหลังกระดูกท้ายกะโหลก เจาะเลือดโดยใช้เข็มเบอร์ 18 ความยาว 1½ นิ้ว ที่บริเวณแอ่งเลือดดำหลังกระโหลก (Anterior dorsal sinus) ด้วยอุปกรณ์และวิธีการที่ปลอดเชื้อ ลงในหลอดที่มีการกระตุ้นให้เลือดเกิดการแข็งตัว (Activated clot tube) ปล่อยให้เลือดเกิดการแข็งตัว เมื่อเลือดแข็งตัวแล้ว ทำการปั่นแยกซีรัม ดูดซีรัมใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก หลอดละ 1 มล. นำไปเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส ทำการระเหิดแห้งด้วยวิธีแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) โดยใช้เครื่อง Freeze dryer (Lyomaster, USA) ค่าเฉลี่ยซีรัม 1 มล.ทำแห้งได้เฉลี่ย 80 มก.

1.2 <u>การเพาะเลี้ยงเซลล์</u> PC12 ตามวิธีการ (Kim JH, 2007; Liu JH ,2003) เพาะเลี้ยงเซลล์ PC12 ในถาดหลุมที่เคลือบผิวด้วยสารcollagen ใช้อาหารเพาะเลี้ยง Proliferative media (DMEM + 5% FBS + 10% HS + 1% penicillin-streptomycin) บ่มที่ 37°C นาน 48 ชั่วโมงจนเซลล์เจริญได้ 70%

1.2.1 <u>ศึกษาผลความเป็นพิษต่อเซลล์ PC12</u> <u>การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์</u>

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของซีรัมเลือดจระเข้ เพื่อหาขนาดสารที่เหมาะสมที่ใช้ทดลอง หลักการ MTT assay (Sladowski D, 1993) คือ สาร MTT หรือ tetrazolium salt ถูกเปลี่ยนเป็นสาร formozan โดยปฏิกิริยาเอนไซม์ succinate dehydrogenase ในขบวนการหายใจที่เกิดขึ้นในไมโตรคอนเดรียของเซลล์มีชีวิต สามารถตรวจวัดสารformozanได้ด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีการโดยย่อคือหลังจากบ่มสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มก./มล. นาน 2 ชั่วโมงกับเซลล์เพาะเลี้ยง จะเกิดผลึกสีน้ำเงินเข้มของ formozan ภายในเซลล์ซึ่งละลายออกมาได้ด้วย DMSO จากนั้นนำไปตรวจวัดปริมาณสารสีโดยการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ยี่ห้อ Biotek รุ่น PowerWave XS

เพาะเลี้ยงเซลล์ PC12 จำนวน 5x 10 ^{4} เซลล์/ หลุม ในถาด 96 หลุม นาน 48 ชั่วโมง ทำการทดลองโดยใส่ซีรัมแห้งจากเลือดจระเข้ ในความเข้มข้นสุดท้าย 40, 20, 4 , 2 , 0.4 mg /ml ในอาหาร (ซีรัมแห้ง 80 มก. ได้จากซีรัมสด 1 มล. ในกรณีไม่เจือจางเมื่อใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ จะ

ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 40 mg/ml) เพาะเลี้ยง เลี้ยง 48 ชั่วโมง และวัดผลเซลล์มีชีวิตโดยวิธี MTT assay. คำนวณหาขนาดสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพื่อใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

1.2.2 <u>ศึกษาผลการปกป้องเซลล์ประสาท ในภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์</u> (Kolla N, 2005)

การทดลองทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ 1 x10^5 cell / 100 µl /well ในถาด 96 หลุม นาน 24 ชั่วโมง ใส่ซีรัมแห้งหรือพลาสม่าแห้งจากเลือดจระเข้ cytoxicity ในขนาด 0.4 , 0.2, 0.04 mg/ml เพาะเลี้ยงต่อ 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 200 µM / well ทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงใหม่ และวัด cell viability ด้วยวิธี MTT การทดลองนี้เปรียบเทียบผลกับวิตามิน อี ขนาด 10 mM ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งๆละ 4 well

12.3 <u>ศึกษาผลต่อการงอกของเซลล์ประสาท</u>

เพาะเลี้ยงเซลล์ PC12ใน proliferative media จำนวน 8 x 10^4 เซลล์/ หลุม ในถาด 24 หลุม นาน 48 ชั่วโมง ถ่ายภาพเซลล์รูปกระสวย เปลี่ยนอาหารเป็น differentiated mediaที่มี NGF 2 ng/ml และใส่ซีรัมจระเข้แต่ละตัวๆละ 2 หลุม /ถาด ขนาดความเข้มข้นสุดท้ายของซีรัมเป็น 40, 4 , 0.4 mg /ml เปรียบเทียบผลค่าเฉลี่ยของจระเข้ 10 ตัว กับกลุ่มควบคุมที่ใส่ differentiated media เสริมด้วย NGF 2 ng/ml และกลุ่ม positive control คือ differentiated media เสริมด้วย NGF 50 ng/ml ในการทดลองใช้ซีรัมเตรียมจากจระเข้ 10 ตัว (n= 10) แต่ละตัว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ยเป็นเป็นผลของซีรัมจระเข้แต่ละตัว การวัดผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope ยี่ห้อ NIKON รุ่น ECLIPSE TS 100-F ทำการบันทึกภาพด้วยโปรแกรม Nikpn ACT -1C for DXM 1200 C จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่มีใยประสาทงอกยาวกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์(neurite- bearing cell) ต่อจำนวนเซลล์นับทั้งหมด 100 เซลล์ ในพื้นที่สุ่ม 3แห่ง/ หลุม 3 หลุม/ถาด 3 ถาด/ การทดลอง แสดงผลเป็นร้อยละของ neurite- bearing cell ต่อจำนวนเซลล์นับ100 เซลล์ (Yamazaki M, 2005; Teng KK, 1993; Das KP, 2004)

12.4 <u>ศึกษากลไกการออกฤทธิ์</u>

การกระตุ้น neurite growth โดยมีการสร้างโปรตีน Mitogen activated protein kinase(MAPK) หรือ MEK1 หลังจากนับเซลล์ที่งอกใยประสาทแล้ว ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์เพื่อตรวจหาปริมาณโปรตีน MEK-1 และตรวจวัดด้วยวิธี enzyme immunoassay kit มีวิธีการโดยย่อคือ Scraped cells โดยใช้เอนไซม์ 0.25% trypsin ปั่นล้างด้วย media 1 รอบที่ 800 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปั่นล้างอีกครั้งด้วย PBS นับปริมาณเซลล์ แล้วใส่ fresh lysis buffer ตามปริมาณเซลล์ที่กำหนด (MEK1 EIA kit, 125 µl lysis buffer for 10^6-10^7 cell/ml) นำไป sonicated บนน้ำแข็ง จากนั้น centrifuge นาน 30 นาที ความเร็วรอบ 12,000 g ที่ 4°C ใน

microcentifuge tube เก็บ Supernatant ที่ –80°C จนกว่าจะทำการตรวจหา total MEK1 ตามวิธีการหา MEK1 EIA kit catalog no. ADI-900-122A

ตาราง 1 แสดงแผนการทดลองข้อ 1.2.3 และ 1.2.4

วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
Feed cell 8 x 10^4 cells/ well in proliferative media	incubate	Culture cell in differentiate media. ให้ intervention: -serum 3 dose -NGF 2 ng/ml =control -NGF 50 ng/ml = + control	incubate	1.นับ neurite bearing cell, 2. Assay for MEK-1

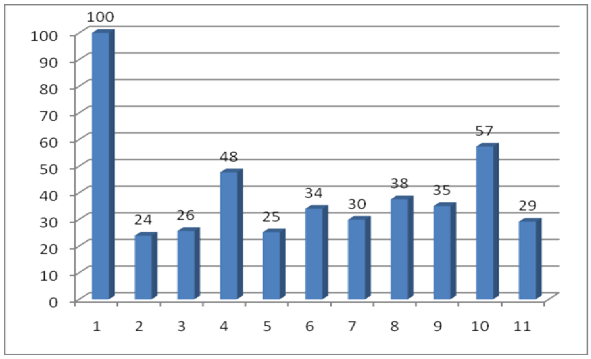
การคำนวณผลสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รวม 3 วันๆละ 2 ชุด เป็น 3 independent experiment ใน แต่ละหัวข้อการทดลอง ผลการทดลองนำเสนอเป็นค่า means ± sd. เปรียบเทียบผล 5 กลุ่มด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย posthoc test วิธี Scheffe ที่นัยสำคัญ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

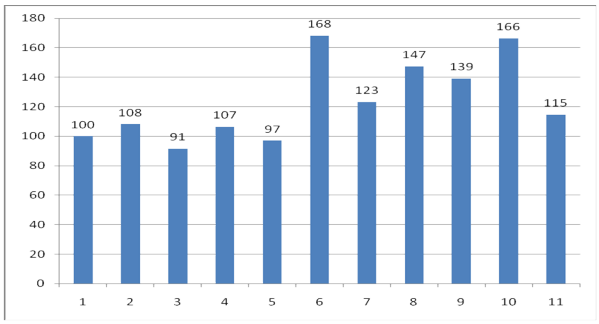
1. ศึกษาผลความเป็นพิษต่อเซลล์ PC12 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

1.1 ผลของซีรัมเลือดจระเข้จำนวน 10 ตัว ที่ความเข้มข้น 40 mg /ml (ไม่เจือจางซีรัม) ต่อการอยู่รอดของเซลล์ PC12 พบว่าซีรัมจากเลือดจระเข้ทั้ง 10 ตัวเมื่อใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง มีผลให้เซลล์ตาย โดยมีร้อยละของเซลล์รอดชีวิตเฉลี่ย 34.6 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่ซีรัมจระเข้



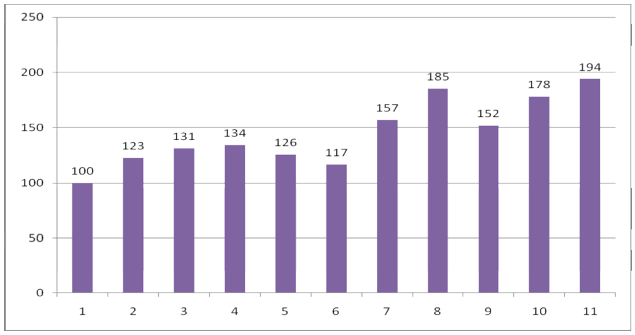
กราฟ 1 แสดงร้อยละจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 1 = control media , 2- 11= ซีรัมเลือดจระเข้ตัวที่ 1-10 (N= 3)

1.2 ผลของซีรัมเลือดจระเข้จำนวน 10 ตัว ความเข้มข้น 4 mg /ml ต่อการอยู่รอดของเซลล์ PC12 พบว่าซีรัมจากเลือดจระเข้ทั้ง 10 ตัวเมื่อใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง มีผลให้เซลล์รอดชีวิตเฉลี่ยร้อยละ 126.1 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่ซีรัมจระเข้



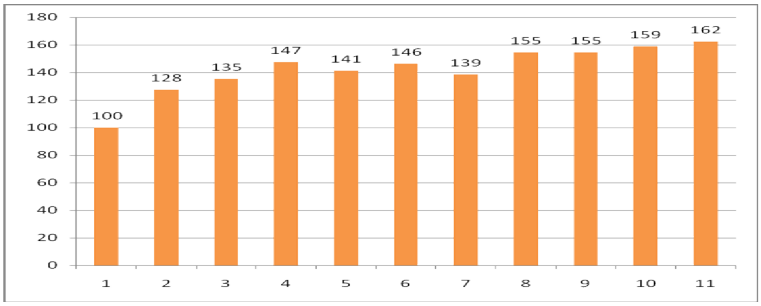
กราฟ 2 แสดงร้อยละจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 1 = control media , 2- 11= ซีรัมเลือดจระเข้ตัวที่ 1-10 (N= 3)

1.3 ผลของซีรัมเลือดจระเข้จำนวน 10 ตัว ความเข้มข้น 0. 4 mg /ml ต่อการอยู่รอดของเซลล์ PC12 พบว่าซีรัมจากเลือดจระเข้ทั้ง 10 ตัวเมื่อใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง มีผลให้เซลล์รอดชีวิตเฉลี่ยร้อยละ 149.7 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่ซีรัมจระเข้



<u>กราฟ3</u> แสดงร้อยละจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 1 = control media , 2- 11= ซีรัมเลือดจระเข้ตัวที่ 1-10 (N= 3)

1.4 ผลของซีรัมเลือดจระเข้จำนวน 10 ตัว ความเข้มข้น 0. 04 mg /ml ต่อการอยู่รอดของเซลล์ PC12 พบว่าซีรัมจากเลือดจระเข้ทั้ง 10 ตัวเมื่อใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง มีผลให้เซลล์รอดชีวิตเฉลี่ยร้อยละ146.7 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่ซีรัมจระเข้

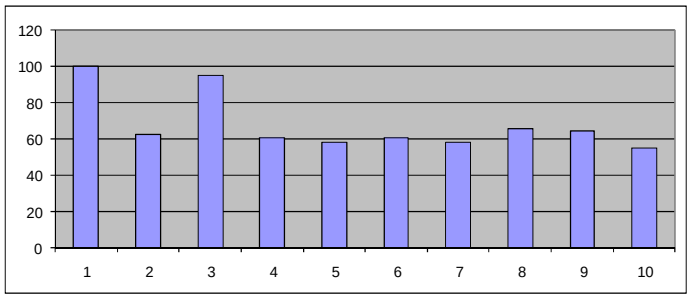


<u>กราฟ4</u> แสดงร้อยละจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 1 = control media , 2- 11= ซีรัมเลือดจระเข้ตัวที่ 1-10 (N= 3)

สรุปว่าที่ซีรัมแห้งจากจระเข้ 10 ตัว ที่ความเข้มข้น 100 % (ไม่เจือจางซีรัมแห้ง) หรือความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 40 mg /ml มีผลให้เซลล์ตาย โดยมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตร้อยละ 34.6 ของกลุ่มควบคุม เมื่อเจือจางซีรัมแห้งตามสัดส่วน เป็น 10% , 1% 0.1 % หรือเทียบเป็นความเข้มข้นสุดท้ายได้ 4 , 0.4 ,0.04 mg/ml ไม่มีผลให้เซลล์ตาย และมีการแบ่งเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตคิดเป็นร้อยละของกลุ่มควบคุมเป็น 126.1, 149.7, 146.7 ตามลำดับ มีความแตกต่างจากกลุ่มความเข้มข้นสูงสุดที่นัยสำคัญ $p < 0.05$ คำนวณด้วยโปรแกรมปริซึม ได้ค่าความเข้มข้นซีรัมจระเข้ที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (IC_{50}) เป็น 25.263 mg/ml

2. ศึกษาผลการปกป้องเซลล์ประสาท ในภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์

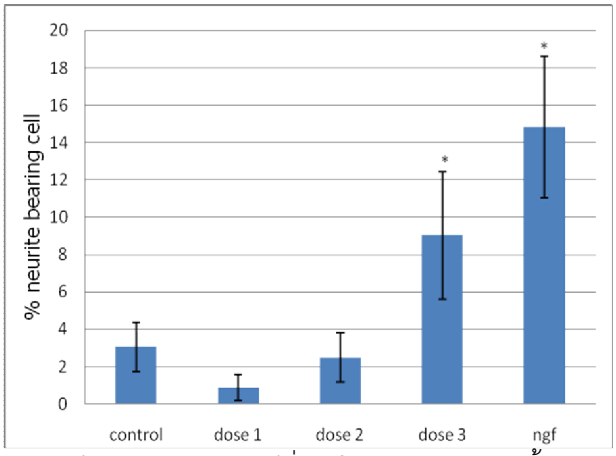
พบว่าซีรัมและพลาสม่าแห้งเลือดจระเข้ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เพาะเลี้ยง PC 12 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไอโดรเจนเปอร์ออกไซด์สอดคล้องกับผลในโครงการวิจัยปี1ที่ได้หาองค์ประกอบทางเคมี และผลสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี BHA, BHT & TBHQ และพบว่าในเลือดจระเข้มีผลต้านอนุมูลอิสระน้อยมาก คือ <0.018, <0.019 & < 0.26 mg/kg ตามลำดับ ดังนั้นจึงงดการดำเนินการในหัวข้อสำหรับฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากโปรตีนอะมีลอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับข้อแนะนำของคณะกรรมการวิจัยผู้ให้ทุนวิจัย



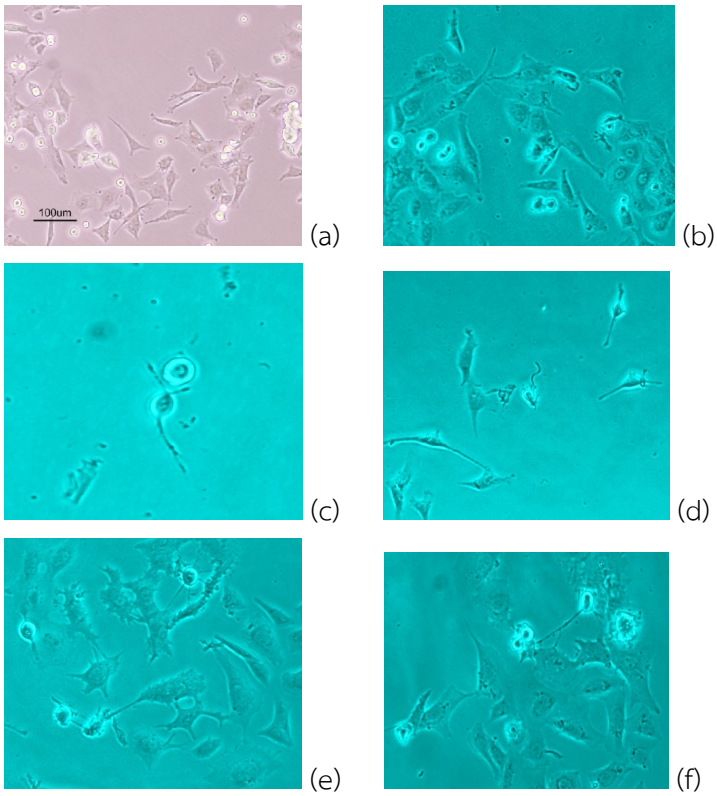
กราฟ5 แสดงร้อยละจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต แท่งที่ 1 = control media ; 2 = hydrogen peroxide 400 µM ; 3 = vit E 10 mM ; 4 = ซีรัม 4.25, mg/ml ; 5 =ซีรัม 2.15 mg/ml ; 6 =ซีรัม 0.425 mg/ml ; 7 = พลาสม่า4.25, mg/ml ; 8 = พลาสม่า 2.15 mg/ml ; 9 =พลาสม่า 0.425, mg/ml ; 10 = heparin; การทดลองที่ 3-10ใส่ซีรัม/พลาสม่า 24 ชั่วโมง แล้วจึงใส่ H_2O_2

3. ศึกษาผลต่อการงอกของเซลล์ประสาท

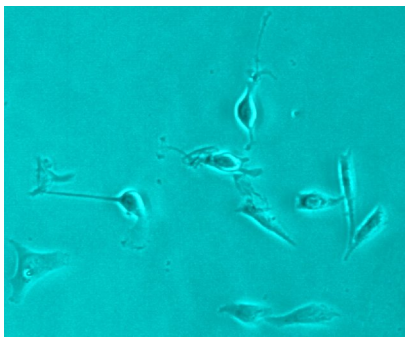
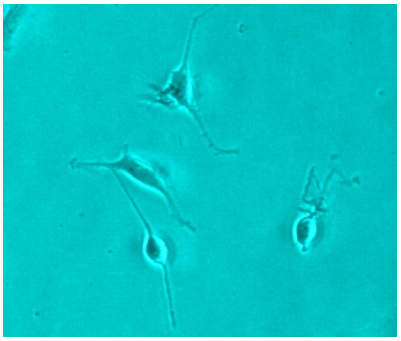
เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะอาหารที่ differentiated media พบว่าซีรัมเลือดจระเข้ขนาด 0.4, 2, 4 mg/ml มีผลให้เซลล์งอกใยประสาทได้ร้อยละ 0.88± 0.68, 2.49 ±1.33, 9.04 ± 3.42 ในจำนวนนับ100เซลล์ กลุ่มควบคุมที่ให้ NGF 2 ng/ml และ 50 ng/ml ซึ่งมีเซลล์งอกใยประสาทได้ร้อยละ 3.05± 1.32 และ 14.81 ± 3.79 (ตารางที่ 1)



กราฟ6 แสดงผลร้อยละจำนวนเซลล์ที่งอกใยประสาท เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารทดลองต่างกัน กราฟแท่ง 1 = กลุ่มควบคุมใช้ DMEM + NGF 2 ng/ml ; กราฟแท่ง 2, 3,4 = ใช้ซีรัมเลือดจระเข้ขนาดความเข้มข้น 0.4, 2, 4 mg/ml + differentiated media + NGF 2 ng/ml; กราฟแท่ง 5 = ใช้ differentiated media + NGF 50 ng/ml



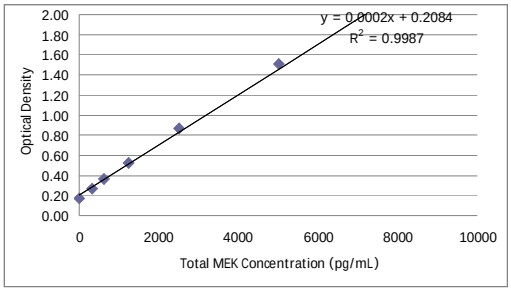
ภาพ1 แสดง ผลของ ngf 2ng/ml (a,b) , ngf 50 ng/ml (c,d), ซีรัม 4 mg/ml (e,f) ต่อการงอกของเซลล์ PC12 เลี้ยงใน differentiative media ในเวลา 2 วัน


(g)

(h)

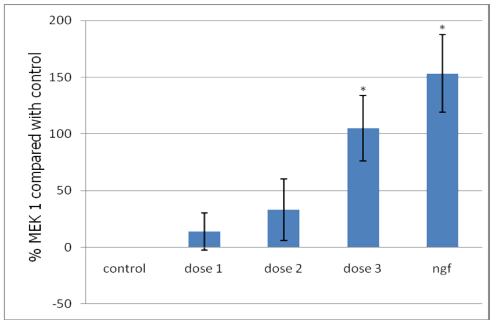
ภาพ2 แสดง ผลของ ngf 50 ng/ml (g, h) ต่อการงอกของเซลล์ PC12 เลี้ยงใน differentiative media ในเวลา 4 วัน

4. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ว่ามีการกระตุ้น neurite growth

เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะอาหารที่ differentiated media พบว่าซีรั่มเลือดจระเข้ขนาด 0.4, 2, 4 mg/ml มีการสร้างโปรตีน MEK 1 เทียบปริมาณเป็นร้อยละของกลุ่มควบคุมได้ 113.8± 16.31, 133.79 ±27.08, 204.83 ± 28.91 กลุ่มควบคุมที่ให้ NGF 50 ng/ml ซึ่งมีเซลล์งอกใยประสาทได้ร้อยละ 253.26± 34.2 (ตารางที่ 1)



กราฟ 7 แสดง standard curve ของการวิเคราะห์ โปรตีน MEK1 ด้วยวิธี Immuno assay.



กราฟ8 แสดงผลปริมาณโปรตีน MEK 1 เป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มควบคุม เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารทดลองต่างกัน กราฟแท่ง 1 = กลุ่มควบคุมใช้ DMEM + NGF 2 ng/ml ; กราฟแท่ง 2, 3,4 = ใช้ซีรั่มเลือดจระเข้ขนาดความเข้มข้น 0.4, 2 , 4 mg/ml + differentiated media + NGF 2 ng/ml; กราฟแท่ง 5 = ใช้ differentiated media + NGF 50 ng/ml

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเซลล์PC12ที่งอกใยประสาท/ 100 เซลล์และ ร้อยละ MEK -1 เทียบกับกลุ่มควบคุม เพาะเลี้ยงใน diferrentiated media นาน 2 วัน

กลุ่มทดลอง	จำนวนเซลล์ที่งอกใยประสาท/ 100 เซลล์	ร้อยละ MEK -1 เทียบกับกลุ่มควบคุม
ซีรัมจระเข้ 0.4 mg/ml	0.88± 0.68	113.8± 16.31
ซีรัมจระเข้ 2 mg/ml	2.49 ±1.33	133.79 ±27.08
ซีรัมจระเข้ 4 mg/ml	9.04 ± 3.42*	204.83 ± 28.91*
NGF 2 ng/ml (กลุ่มควบคุม)	3.05 ± 1.32	100
MGF 50 ng /ml	14.81 ± 3.79*	253.26± 34.2*

แตกต่างจากกลุ่มทดลอง NGF 2 ng/ml ที่นัยสำคัญสถิติ $p < 0.05$ *

อภิปรายและวิจารณ์ผล

ซีรั่มแห้งเลือดจระเข้ ขนาดความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 เป็น 25.26mg/ml. ส่วนความเข้มข้น 4 mg/ml ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 แต่มีผลให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่ม มีผลต่อการงอกใยประสาทเพิ่มขึ้นต่างจากกลุ่มควบคุม ในการทดลองนี้ซีรั่มสดจากเลือดจระเข้ 1 ml. ทำแห้งได้หนักเฉลี่ย 80 มก. ซีรั่มแห้งจากจระเข้เพศผู้และเมียมีสาร IGF โดยเฉลี่ย 70 ng/ml (จินดาวรรณ, 2553) การทดลองได้ใช้ซีรั่มแห้งความเข้มข้น 4, 0.4 และ 0.04 mg/ml จึงมีสาร IGF-1 เทียบเท่ากับ 3.5, 1.75 และ 0.35 ng/ml จากการทบทวนวรรณกรรมงานวิจัยพบว่า สาร IGF-1 ขนาด 0.5-2 µg/ml มีผลต่อการรอดเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 ในอาหาร differentiaed media ได้ (Gil-Ad I, 1999) จึงเป็นเหตุผลอธิบายได้ว่าซีรั่มแห้งเลือดจระเข้ขนาด 4 mg/ml มีผลให้เซลล์งอกใยประสาทได้ เพราะมีสาร IGF-1 ในปริมาณหนึ่งและอาจมีสารอื่นที่ออกฤทธิ์เสริมได้เช่นกัน เหตุผลสนับสนุนอีกประการคือสาร NGF และ IGF-1 ออกฤทธิ์ยับยั้งการตายของเซลล์จาก programmed cell dead (PCD) โดยกลไกจับที่ receptor เดียวกัน และถูกยับยั้งด้วย inhibitor เดียวกัน (Miller TM, 1997) ดังนั้นในกลุ่มการทดลองที่ได้รับ NGF 50 mg/ml จึงได้ผลต่างจากกลุ่มควบคุม ความสำคัญของ IGF-1 เกี่ยวกับคนได้มีการศึกษาปริมาณของ IGF-1 ในคนพบว่าทั้งในเพศหญิงและชายปริมาณของ IGF-1 จะค่อยลดลงเมื่ออายุเพิ่มมาก (Plengpanich W, 2008) ดังนั้นซีรั่มเลือดจระเข้จึงช่วยเพิ่มปริมาณ IGF-1และมีผลบำรุงเซลล์ประสาทด้วย

ผลของซีรั่มเลือดจระเข้ต่อการสร้างโปรตีน mitogen-activated protein kinase (MAPK) หรือ MEK-1 พบว่าในขนาดความเข้มข้น 4 mg/ml มีการสร้าง MEK-1 เพิ่มขึ้นต่างจากกลุ่มควบคุม

แต่ไม่มากเท่ากับกลุ่มที่เสริมด้วย NGF 50 ng/ml ($p< 0.05$) สาร MEK-1 นี้สื่อถึงกระบวนการมีชีวิตของเซลล์ในการเปลี่ยนรูปร่าง การแบ่งเซลล์ เมื่อกระตุ้นเซลล์ PC12 ด้วยสาร NGF จะมีการสร้างโปรตีน MAPK ขึ้นอย่างรวดเร็วในเวลา 5 นาที และมีผลอยู่นาน (Ebrahimi A, 2012) ในการทดลองนี้วัดผลการงอกใยประสาทและตรวจวิเคราะห์โปรตีนMEK-1ในวันที่ 2 หลังจากให้สารทดลองแล้ว ทั้งนี้เพราะได้มีงานวิจัยว่า การเติม NGF มีผลให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่างเห็นได้ใน 48 ชั่วโมง (Liu JH, 2003) และภายหลังจาก 48 ชั่วโมงเซลล์ในบางกลุ่มทดลองจะตายทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์โปรตีน MEK1 ได้ครบทุกการทดลอง อีกทั้งในการทดลองได้เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงจาก complete media เป็น differentiated media เพื่อให้เซลล์งอกใยประสาท ในอาหารมีส่วนประกอบที่ต่างกันโดยลดปริมาณ fetal bovine serum 5% เป็น 1% และ horse serum 10% เป็น 5% ซึ่งไม่เพียงพอกับการอยู่รอดของเซลล์ได้เกิน 2 วัน แต่อย่างไรก็ตามในกลุ่มที่ให้ NGF 50 ng/ml และกลุ่มซีรั่มจระเข้ 4 mg/ml ได้ทดลองติดตามผลต่ออีก 4 วัน และพบว่ามีเส้นใยประสาทยาวมากขึ้นดังภาพที่ 2 ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Teng KK และคณะ เกี่ยวกับผลของ NGF ต่อความยาวใยประสาทในเวลา 14 วัน ที่พบว่าจำนวนเซลล์งอกใยประสาทเพิ่มประมาณร้อยละ 20 ในวันที่ 4 และเห็นใยประสาทยาวชัดเจนในวันที่ 7 (Teng KK, 1993)

ดังจะเห็นได้ว่าร้อยละจำนวนเซลล์ที่งอกใยประสาท และปริมาณโปรตีน MEK-1 ในกลุ่มการทดลองขนาดความเข้มข้น 4 mg/ml ให้ผลแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ถึงแม้จะไม่ให้มากเท่ากับการให้ NGF 50 ng/ml ก็ตาม มีงานวิจัยที่ทำการกระตุ้นเซลล์ PC12 ซ้ำ โดยให้ NGF 50 ng/ml ในเวลา 0, 12 ชั่วโมง พบว่าในเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นครั้งแรก ก็เพียงพอให้เซลล์งอกใยประสาทได้ และเมื่อกระตุ้นซ้ำครั้งที่ 2 มีผลให้ใยประสาทงอกยาวขึ้นอีก (Chung J, 2010) ซึ่งแสดงว่าการงอกใยประสาทเมื่อได้รับสารกระตุ้นซ้ำจะได้ผลดีขึ้น เช่นเดียวกับการใช้ยาบำรุงซึ่งต้องใช้ต่อเนื่องระยะเวลาหนึ่ง

สำหรับผลต้านอนุมูลอิสระ พบว่าซีรั่มและพลาสม่าจากเลือดจระเข้ไม่มีผลในการปกป้องเซลล์ประสาทจากการตายด้วยอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สอดคล้องกับโครงการวิจัยปี 1ที่ได้หาผลสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี BHA, BHT & TBHQ และพบว่าในเลือดจระเข้มีผลต้านอนุมูลอิสระน้อยมาก จึงไม่มีการทดลองต่อในฤทธิ์ดังกล่าว

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ซีรั่มแห้งจากเลือดจระเข้มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 โดยทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น (IC_{50}) 25.26 mg/ml และที่ความเข้มข้น 4 mg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ดังกล่าว อีกทั้งยังมีผลทำให้เซลล์แบ่งตัวมากขึ้น ทำให้มีจำนวนเซลล์ที่งอกใยประสาทมากขึ้น มีการ

สร้างโปรตีน MEK-1 ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการแบ่งเซลล์ เปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์เพิ่มขึ้น ผลนี้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ $p< 0.05$ แต่ไม่มากเท่ากลุ่มที่เสริมด้วยสาร nerve growth factor (NGF) 50 ng/ml ทั้งนี้น่าจะเพราะในซีรั่มดังกล่าวอาจมีออกฤทธิ์ เช่นสาร Insulin like growth factor หรือ IGF-1 ที่มีผลต่อการงอกใยประสาท โดยมีกลไกการออกฤทธิ์จับ receptor เดียวกับสาร NGF สาร NGF นี้มีค่าช่วงชีวิตสั้นจึงไม่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาได้ การที่ซีรั่มเลือดจระเข้ที่มีสาร IGF-1 และมีฤทธิ์ต่อเซลล์ประสาทเหมือน NGF จึงน่าจะนำมาพัฒนาเป็นยาบำรุงเซลล์ประสาทได้ โดยอาจสกัดสาร IGF-1 จากซีรั่มจระเข้และนำมาทดสอบซึ่งน่าจะเห็นผลต่อเซลล์ประสาทได้ชัดเจนมากขึ้น อนึ่งจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าการให้สาร NGF กระตุ้นซ้ำมีผลให้เซลล์ PC 12 งอกใยประสาทได้ยาวขึ้น จึงสอดคล้องกับลักษณะการใช้ยาบำรุงซึ่งต้องใช้ติดต่อกันระยะเวลาหนึ่ง แต่มีข้อควรระวังเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์ ถึงแม้จะมีการใช้เลือดจระเข้มานานในตำรายาก็ตาม แต่การนำมาใช้ในลักษณะเป็นยาเดี่ยวและมีการเปลี่ยนแปลงโดยทำแห้ง จึงน่าจะมีการทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังหรือติดตามผลการใช้ตามขั้นตอนการทดสอบยาขั้นคลินิกในคนปกติและผู้ป่วยจำนวนน้อยก่อน

บรรณานุกรม

1. จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ, วิน เชยชมศรี , สิทธิธนา อาดำ. การตรวจหาไอจีเอฟ-วัน (Insulin like Growth Factor-1, IGF-1) ในซีรัมจระเข้เพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ. วารสารวิจัยและนวัตกรรมเพื่ออุตสาหกรรมไทย 2553; 1 (2) : 12-15.
2. จุฑามณี สุทธิสีสังข์. ความก้าวหน้าทางเภสัชวิทยา. นงลักษณ์ สุขวาณิชย์ศิลป์ บรรณาธิการ, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2546 : 128-32.
3. Bachurin S, Bukatina E, Lermontova N, Tkachenko S, Afanasiev A, Grigoriev V, Grigorieva I, Ivanov Y, Sablin S, Zefirov N . Antihistamine agent Dimebon as a novel neuroprotector and a cognition enhancer. Ann N Y Acad Sci. 2001; 939:425-35.
4. Chung J, Kubota H, Ozaki Yi, Uda S, Kuroda S. Timing-dependent actions of NGF required for cell differentiation. PLoS ONE 2010; 5 (2) : e9011.
5. Crain DA, Gross TS, Cox MC, Guillette LJ. Insulin-like growth factor-I in the plasma of two reptiles: assay development and validations. Gen Comp Endocrinol. 1995; 98(1):26-34.

6. Das KP, Freudenrich TM , Mundy WR. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. Neurotoxicology and Teratology 2004; 26: 397-406.

7. Deshmukh M, Johnson EM. Programmed cell death in neuron: focus on the pathway of nerve growth factor deprivation-induced death of sympathetic neurons. Mol Pharmacol.1997; 51 : 897-906.

8. Ebrahimi A , Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. Ageing Research Reviews 2012; 11: 329–45.

9. Hawes JJ, Narasimhaiah R, Picciotto MR. Galanin and galanin-like peptide modulate neurite outgrowth via protein kinase C-mediated activation of extracellular signal-related kinase. Eur J Neurosci. 2006; 23(11) : 2937-46.

10. Hwang SL, Shih PH, Yen GC. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. J Agric Food Chem. 2012 ; 60(4):877-85.

11. Gil-Ad I, Shtaif B, Luria D, Karp L, Fridman Y, Weizman A. Insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) antagonizes apoptosis induced by serum deficiency and doxorubicin in neuronal cell culture. Growth Horm IGF Res. 1999 ; 9 (6) :458-64.

12. Guillette LJ Jr, Cox MC, Crain DA. Plasma insulin-like growth factor-I concentration during the reproductive cycle of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Gen Comp Endocrinol 1996; 104(1):116-22.

13. Kim JH, Ha HC, Lee MS, Kang JI, Kim HS, Lee SY, Pyun KH, Shim I. Effect of *Tremella fuciformis* on the neurite outgrowth of PC12h cells and the improvement of memory in rats. Biol Pharm Bull 2007; 30(4) : 708-14.

14. Kolla N, Wei Z, Richardson S, Li X-M. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. J Psychiatr Neurosci 2005; 30(3): 196-201.

15. Lin CC, Shyr MH, Chien CS, Wang CC, Chiu CT, Hsiao LD, Yang CM. Thrombin-stimulated cell proliferation mediated through activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway in canine cultured tracheal smooth muscle cells. Cell Signal 2002 ; 14(3):265-75.

16. Liu JH, Bao YM, Song J, An L. *Cadonopsis pilosula* (Franch) Nannj total alkaloids potentiate neurite outgrowth induced by nerve growth factoring PC12h cells. Acta Pharmacol Sin 2003; 24(9): 913-7.

17. Miller TM, Tansey MG, Johnson EM , Creedon DJ. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization and insulin-like growth factor 1-mediated survival of cerebellar granule cells. J Biol Chem 1997; 272 **:** 9847–53.

18. Miranda MB, McGuire TF, Johnson DE. Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines. Leukemia. 2002 ; 16 (4): 683-92.

19. Plengpanich W, Mangkala J, Buranasukaiorn P, Boonruang K, Sunthornyothin S, Suwanwalaikorn S, Khovidhunkit W, Sridama V, Snabboon T. Normal reference range of serum insulin-like growth factor (IGF)-I in healthy Thai adults. J Med Assoc Thai 2008; 91 : 1681-4.

20. Seger, R.; Krebs, E. G. The MAPK signaling cascade. FASEB J 1995; 9: 726-35.

21. Shin YH ; Wu SL ; Chiou WF ; Ku HH ; Ko TL ; Fu YS . Protective effects of tetramethylpyrazine on kainate-induced excitotoxicity in hippocampal culture. Neuroreport 2002; 13 (4) : 515-19.

22. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. An improved MTT assay. J Immuno Methods 1993; 157(1-2) : 203-7.

23. Teng KK, Georgieff IS, Aletta JM, Nunez J, Shelanski ML, Greene La. Characterization of a PC12 ceall sub-clone (PC12-C41) with enhanced neutrite outgrowth capacity: implications for a modulatory role of high molecular weight tau in neuritogenesis . Jour Cell Sci 1993; 106:611-26.

24. Vornov J J., ParkJ. Thomas AG. Regional vulnerability to endogenous and exogenous oxidative stress in organotypic hippocampal culture. Exp Neurol 1998; 149 (1):109-22.

25. Yamazaki M, Chiba K, Mohri T. Fundamental role of nitric oxide in neuritogenesis of PC12h cells. Br J Pharmacol. 2005; 146(5): 662-9.

26. Yamazaki M, Chiba K, Mohri T. Differences in neuritogenic response to nitric oxide in PC12 and PC12h cells. Neurosci Lett. 2006; 93(2-3):222-5.

ภาคผนวก

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ในการทดลอง

	Growth /Proliferation medium				Differentiation medium		
	464 ml	232 ml	116 ml		428 ml	214 ml	107 ml
DMEM	400	200	100	**DMEM**	400	200	100
% 5 FBS	20	10	5	**% 1 FBS**	4	2	1
% 10 HS	40	20	10	**% 5 HS**	20	10	5
% 1 P/S	4	2	1	**% 1 P/S**	4	2	1