รายงานการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของออกซิเรสเวอราทรอล

Study of neuroprotective properties of oxyresveratrol

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ

รองศาสตราจารย์ ดร. บุญชู ศรีตุลารักษ์

รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ จันทร์วรโชติ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2557 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในการทำวิจัย ทำให้งานในโครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

สาร oxyresveratrol เป็นสารในกลุ่ม polyphenolic stilbene ซึ่งพบในพืชวงศ์ขนุนหลายชนิด เช่น หม่อน และมะหาด สารนี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย ได้มีผู้เสนอความเห็นว่าสารนี้อาจมีศักยภาพในการปกป้องเซลล์ประสาท เพราะมีรายงานว่า oxyresveratrol สามารถลดอาการบาดเจ็บของสมองหนูที่ขาดเลือดอย่างเฉียบพลัน และสามารถป้องกันเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากพิษของ β-amyloid ได้ โครงการวิจัยนี้จึงได้ดำเนินการโดยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาศักยภาพของ oxyresveratrol ในการปกป้องเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง 2 ชนิดคือเซลล์ P19 และ SH-SY5Y

ในการทดลองกับเซลล์ประสาท P19 นั้น ได้ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์โดยการงดให้ซีรัม (FBS) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากผลการทดลอง พบว่า oxyresveratrol ในขนาด 1 ng/ml สามารถป้องกันเซลล์จากภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากการงดอาหารซีรัมได้ โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์คิดเป็นร้อยละ 67.60 ± 0.91 ซึ่งสูงกว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ไม่ได้รับ oxyresveratrol ซึ่งอยู่ที่ร้อยละ 40.15 ± 6.82 อนึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าในการทดลองนี้ oxyresveratrol มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทสูงกว่า Trolox และ vitamin C ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันที่รู้จักกันดี นอกจากนี้โครงการวิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของ dihydrooxyresveratrol ด้วย แต่พบว่าสารนี้มีฤทธิ์อ่อนกว่า oxyresveratrol ส่วนการทดลองกับเซลล์ SH-SY5Y นั้น ได้ใช้ dexamethasone ในขนาด 50 และ 100 μM เหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย จากผลการทดลอง พบว่าในสภาวะการทดลองดังกล่าว oxyresveratrol ในขนาด 5-40 μM ไม่สามารถลดอัตราการตายของเซลล์ได้

สรุปได้ว่าผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า oxyresveratrol ซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติ สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท P19 ในภาวะขาดซีรัมในอาหารได้ แต่ไม่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ที่เกิดจากพิษจากการเหนี่ยวนำโดย dexamethasone ซึ่งเป็นสาร glucocorticoid ข้อมูลใหม่ซึ่งได้จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นสิ่งที่ยืนยันว่า oxyresveratrol มีศักยภาพในการปกป้องเซลล์ประสาท และชี้ให้เห็นว่าเราควรจะศึกษาฤทธิ์ของสารนี้ต่อไป โดยใช้แบบจำลองในหลอดทดลองอื่น และในสัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้หลักฐานเพิ่มเติม ที่สนับสนุนฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารนี้

Abstract

Oxyresveratrol is a polyphenolic stilbene found in several plants in the family Moraceae, for example, *Morus alba* L. and *Artocarpus lakoocha* Roxb. The compound has been reported for a wide range of biological activities. Its potential application as a neuroprotectant has been suggested from its ability to reduce injury in acute brain ischemia in rats, and prevent cultured rat cortical neurons from β-amyloid-induced damage. This research project was undertaken to examine the *in vitro* neuroprotective potential of oxyresveratrol in two neuronal cell lines, including P19-derived neurons and SH-SY5Y neuroblastoma cells.

In an experiment with P19-derived neuronal cells, cell death was induced by withdrawal of the serum (FBS) from the media. Oxyresveratrol at 1 ng/ml was found to protect the cells against the oxidative stress produced in the system. High cell viability (67.60 ± 0.91 %) was found for the cells treated with oxyresveratrol, whereas only 40.15 ± 6.82 % cell viability was observed for the untreated cells. Interestingly, the neuroprotective property of oxyresveratrol was greater than those of the well-known antioxidants Trolox and vitamin C. Dihydrooxyresveratrol, a hydrogenation product of oxyresveratrol, was also evaluated in a similar manner, but this compound exhibited lower neuroprotective activity. In the experiment with SH-SY5Y cells, dexamethasone (50 or 100 μM) was employed to induce apoptosis, and oxyresveratrol (5-40 μM) was given. The data indicated that oxyresveratrol could not reduce cell death caused by dexamethasone under the present experimental condition.

In conclusion, our experimental results showed that the naturally occurring oxyresveratrol could enhance the survivial of P19-derived neuronal cells in serum-deprivation condition, but could not protect SH-SY5Y neuroblastoma cells against the apoptosis induced by the glucocorticoid dexamethasone. The new findings from this study confirm the potential use of oxyresveratrol as a neuroprotectant, and suggest that further investigation to obtain more supporting evidence, in other *in vitro models* as well as in animals, should be pursued.

สารบัญเรื่อง

กิติกรรมประกาศ.....i

บทคัดย่อ.....ii

Abstract.....iii

สารบัญตาราง.....v

สารบัญภาพ.....vi

บทที่

1. บทนำ.....1

2. วิธีดำเนินการวิจัย.....3

3. ผลการทดลอง การอภิปราย และสรุปผล.....9

4. บรรณานุกรม.....14

สารบัญตาราง

(1) ตารางที่ 2.1 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท P19 เมื่อได้รับสารทดสอบ.....5

(2) ตารางที่ 3.1 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท P19 ในสภาวะขาดอาหารซีรัม.....9

สารบัญรูป

(1) **รูปที่ 2.1** อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท SH-SY5Y เมื่อได้รับ oxyresveratrol 10-200 μM 7

(2) **รูปที่ 2.2** อัตราการรอดของเซลล์ SH-SY5Y เมื่อได้รับสาร dexamethasone 25–150 μM 8

(3) **รูปที่ 3.1** อัตราการรอดของเซลล์ P19 เมื่อได้รับสาร oxyresveratrol 1 ng/mlหรือ dihydrooxyresveratrol 1,000 g/ml เทียบกับกลุ่มควบคุม.....9

(4) **รูปที่ 3.2** อัตราการรอดของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร dexamethasone 100 μM ร่วมกับ oxyresveratrol 10-40 μM.....10

(5) **รูปที่ 3.3** อัตราการรอดของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับ dexamethasone 100 μM หลังจากได้รับสาร oxyresveratrol 5-40 μM เป็นเวลา24 ชั่วโมง.....10

(6) **รูปที่ 3.4** อัตราการรอดของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับ dexamethasone 50 μM หลังจากได้รับสาร oxyresveratrol 5-40 μM เป็นเวลา24 ชั่วโมง.....11

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 สังคมไทยได้ก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงวัย ได้มีการคาดการณ์ว่าในอีกประมาณ 15 ปี จำนวนผู้สูงวัยจะเพิ่มขึ้นเป็น 23 % ของจำนวนประชากรวัยทำงาน ซึ่งจะเป็นสัดส่วนที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยของประเทศอื่นๆ ในทวีปเอเชียยกเว้นจีนและญี่ปุ่น ในอนาคตอันใกล้นี้ การจัดบริการด้านสาธารณสุขให้แก่ผู้สูงวัยซึ่งได้แก่การดูแลสุขภาพ การป้องกันและรักษาโรคของคนชราจะเป็นโจทย์ที่ท้าท้ายสำหรับประเทศไทย รัฐจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเข้ามากำกับดูแลและพัฒนาการสาธารณสุขสำหรับผู้สูงวัยให้มีประสิทธิภาพและครอบคลุมคนชราทุกกลุ่ม เพื่อตอบสนองความต้องการของสังคมที่เปลี่ยนไป ภายใต้กรอบงบประมาณและทรัพยากรของประเทศที่มีอย่างจำกัด

ปัญหาสุขภาพหรืออาการป่วยที่พบบ่อยในผู้สูงวัย หรือผู้ที่มีอายุตั้งแต่อายุ 65 ปีขึ้นไปนั้น ได้แก่ความผิดปกติของระบบโลหิต และความเสื่อมของระบบประสาท ในกรณีความผิดปกติของระบบประสาทนั้น มักเกิดจากการที่สมองสูญเสียความสามารถในการควบคุมสั่งการอวัยวะอื่นๆ โดยมีสาเหตุมาจากการที่เซลล์สมองถูกทำลาย หรือถูกขัดขวางการทำงาน หรือขาดสารสื่อประสาทในเนื่อเยื่อสมอง ตัวอย่างของโรคผู้สูงวัยที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทในสมองเช่นโรคความจำเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ (Alzhiemer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) และโรคซึมเศร้า (depression) สาเหตุที่ทำให้ผู้สูงวัยป่วยเป็นโรคเหล่านี้ยังไม่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามหากเราสามารถป้องกันไม่ให้ผู้สูงวัยมีอาการผิดปกติเหล่านี้ได้ ก็จะทำให้ผู้สูงวัยมีสุขภาพแข็งแรง มีคุณภาพชีวิตที่ดี ไม่เป็นภาระแก่ครอบครัวและคนใกล้ชิด ซึ่งจะส่งผลดีต่อสังคมโดยรวม นอกจากนี้เมื่อพิจารณาในแง่เศรษฐกิจ การป้องกันโรคมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการรักษาโรค ทำให้รัฐสามารถประหยัดงบประมาณรายจ่ายในปัญหาสาธารณสุขส่วนนี้ได้ เป็นที่ทราบกันดีว่าประเทศไทยอุดมไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติ มีพืชสมุนไพรมากมาย หากเราสามารถนำพืชสมุนไพรเหล่านี้มาพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยาช่วยป้องกันการเสื่อมของสมอง ก็จะเป็นการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพ อย่างคุ้มค่า ช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่พืชสมุนไพร

สาร oxyresveratrol มีโครงสร้างหลักเป็น stilbene พบได้ในพืชหลายชนิดในวงศ์ Moraceae ในประเทศไทยพืชที่พบว่าสร้าง oxyresveratrol ในปริมาณสูงได้แก่ หม่อน *Morus alba* L. และมะหาด *Artocarpus lakoocha* Roxb. [1, 2] ได้มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ชีวภาพของ oxyresveratrol มากมาย เช่น ฤทธิ์ทำให้ผิวขาว (skin whitening) ในเครื่องสำอางได้ [3, 4] มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริม [5] เมื่อนำ oxyresveratrol มาบรรจุในระบบส่งยาที่เหมาะสมจะสามารถยับยั้งไวรัสเริมที่ผิวหนังใกล้เคียงกับยาต้านไวรัส acyclovir [6] การศึกษาในหนูทดลองพบว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ต้านอักเสบ (anti-inflammatory) [1] เนื่องจากเป็น antioxidant ที่สูง สามารถจับอนุมูลอิสระได้ดี [7, 8] จึงสามารถปกป้อง DNA ได้ [9] การทดลองในหนูชี้ให้เห็นว่า oxyresveratrol สามารถยับยั้งการตายแบบ apotosis ของเซลล์ใน

สมองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด cerebral ischemia ได้ [10] นอกจากนี้ oxyresveratrol ยังสามารถปกป้องเซลล์ cerebral cortical neurons จากพิษของ β-amyloid peptide ได้ด้วย [11] การทดสอบโดยใช้ enzyme assay kit พบว่า oxyresveratrol สามารถยับยั้งเอนไซม์ β-secretase [12] เมื่อนำสารมาศึกษาความสามารถในการซึมผ่าน blood brain barrier (BBB) พบว่า oxyresveratrol ซึมผ่าน BBB ได้น้อยในหนูที่อยู่สภาวะปกติ แต่หากทำให้เกิด middle cerebral artery occlusion (MCAO) แล้วสารจะซึมผ่าน BBB ได้มากขึ้นเป็น 6 เท่าในบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิด infarction [13] นอกจากยังมีรายงานการวิจัยที่พบว่า oxyresveratrol สามารถปกป้องเซลล์ neuroblastoma จากพิษของ 6-hydroxydopamine [14] ซึ่งหมายถึงความเป็นไปได้ที่อาจนำสารนี้มาใช้บรรเทาอาการ Parkinson's disease ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของ oxyresveratrol ในการใช้ป้องกันหรือบรรเทาอาการของโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของเซลล์ประสาทในสภาวะต่างๆ

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของ oxyresveratrol ในด้านต่างๆที่กล่าวมาข้างต้น แต่ยังไม่มีรายงานฤทธิ์ของ oxyresveratrol ในการป้องกันเซลล์ประสาทจากพิษของสารพวก corcticosteroids หรือจากสภาวะพิษซึ่งเกิดจากการขาดสารอาหาร พิษของ glucocorticioids เกิดขึ้นโดยการที่สาร corcticosteroid ไปยับยั้ง uptake ของ glutamate และ glucose ของเซลล์ ส่วนสภาวะพิษจากการขาดอาหาร เกิดขึ้นได้เนื่องจากสภาวะดังกล่าวทำให้เกิด oxidative stress คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาศักยภาพของ oxyresveratrol ในการปกป้องเซลล์ประสาทในสภาวะที่เป็นพิษทั้งสองที่กล่าวมา

วัตถุประสงค์และขอบเขตการทำวิจัย

โครงการวิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาฤทธิ์ของ oxyresveratrol ในการปกป้องเซลล์ประสาทที่ยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อน โดยมีขอบเขตการวิจัยดังนี้

(1) ศึกษาศักยภาพของ oxyresveratrol ในการปกป้องเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากพิษจากสภาวะ oxidative stress ซึ่งเกิดจาก serum deprivation

(2) ศึกษาศักยภาพของ oxyresveratrol ในการปกป้องเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงซึ่งได้รับพิษที่เกิดจาก dexamethasone ซึ่งจัดเป็น glucocorticosteroid

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลวิจัยที่ได้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ เป็นข้อมูลซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยพืชสมุนไพรที่มีสาร oxyresveratrol เป็นสารสำคัญ เพื่อใช้ในการพัฒนาต่อยอดให้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพสำหรับป้องกันอาการ หรือโรคที่เกี่ยวข้องการเสื่อมของเซลล์ประสาท

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การสกัดแยกเอา oxyresveratrol และการเตรียม dihydrooxyresveratrol

เก็บตัวอย่างพืชคือแก่นต้นมะหาด *Artocarpus lakoocha* Roxb. จากจังหวัดเชียงใหม่ นำมาอบแห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 ºC แล้วแช่สกัดด้วย MeOH นำสารสกัด MeOH ที่ได้มาแยกต่อด้วยเทคนิคทาง chromatography หลายวิธี แล้วตกผลึก เก็บผลึกสาร oxyresveratrol ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยวิธี HPLC และพิสูจน์ยืนยันโครงสร้างสารด้วยวิธี NMR spectroscopy และ mass spectrometry [5].

การเตรียม dihydrooxyresveratrol ทำได้โดยนำ oxyresveratrol มาทำปฏิกริยา hydrogenation กับ H_2 โดยมี Pd/C เป็นสารเร่งปฏิกริยานำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วตรวจสอบพิสูจน์โครงสร้างด้วยวิธี NMR spectroscopy และ mass spectrometry [3]

2.2 การศึกษาศักยภาพของ oxyresveratrol ในป้องกันเซลล์ประสาทจากพิษของ oxidative stess ที่เหยี่ยวนำโดยวิธี serum deprivation

วิธีดำเนินการทดลองนี้ดัดแปลงมาจากวิธีที่ MacPherson และคณะรายงานไว้ [16, 17]

2.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ P-19

ใช้ sterile pipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าที่มีเซลล์ P-19 เจริญอยู่ออกจาก T-75 flask เติม sterile PBS 2 mL เพื่อล้างเซลล์แล้วดูดทิ้ง เติม 0.25%w/v trypsin ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาทีแล้วดูดทิ้งเพื่อย่อยเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว เติม P19GM (α-MEM + 7.5%NCS + 2.5% FBS) 2 mL จากนั้นปิเปตขึ้น-ลงสลับกัน (titurate) ประมาณ 50-60 ครั้งให้เซลล์กระจายตัว นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ hematocytometer นับเฉพาะส่วนที่ไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue คำนวณอัตราเซลล์เพาะเลี้ยงเริ่มต้นให้มีความหนาแน่น 1×10^5 cell/mL ดูดเซลล์เก่าออกให้เหลือเซลล์เท่ากับปริมาณที่คำนวณได้ แล้วเติมอาหาเลี้ยงเซลล์ P19GM เข้าไปจนครบ 10 mL นำไปเข้าตู้บ่มเพาะที่ 37˚C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5%CO_2, ความชื้น 10% ทำการ subculture ทุก 2-3 วัน

2.2.2 การเหนี่ยวนำให้เซลล์ P-19 เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท

2.2.2.1 ใช้ sterile pipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจาก T-75 flaskเติม sterile PBS 2 mL เพื่อล้างเซลล์แล้วดูดทิ้ง เติม 0.25%w/v trypsin ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วดูดทิ้งเพื่อย่อยเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว เติม P19IM (α-MEM + 5% FBS) 2 mL แล้ว titurate ประมาณ 50 ครั้งให้เซลล์กระจายตัว ใช้ sterile pipette ดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ลงใน petridish แล้วเติมP19IM จนครบ 10 mL เติม all *trans*-retinoic acid (RA) ลงไปใน petridish ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 µM จากนั้นจึงแกว่ง petridish ให้ retinoic acid กระจายจนทั่ว นำไปเข้าตู้บ่มเพาะที่ 37˚C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5%CO_2, ความชื้น 10% เป็นเวลา 5 วันเซลล์จะเกิดการรวมกลุ่มเป็น embryoid bodies (เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน)

2.2.2.2 ใช้ sterile pipette ดูดเอา embryoid bodies ออกมาใส่ใน sterile centrifuge tube ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีให้ตกตะกอน จากนั้นจึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้เหลือปริมาตร 2 mL แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 1500 rpm อุณหภูมิ

25 ºC เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา 5 นาที ดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจนหมดแล้วเติม α-MEM 2 mL นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 1500 rpm อุณหภูมิ 25 ºC เป็นเวลา 5 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) นำ α-MEM ออก แล้วเติม P19SM (α-MEM + 10% FBS) 2 mL, titurate 50 ครั้ง นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ hematocytometer นับเฉพาะส่วนที่ไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue ทำการ seed cell ลงใน Poly-L-Lysine pre-coated 96-well plate* ให้มีเซลล์เริ่มต้น 7 x 10^4 cell/mL ปริมาตรที่ใช้ในการ seed 150 µL/well (กรณีที่ใช้ 6-well plate ปริมาตรในการ seed จะเป็น 2 mL/well)

หมายเหตุ: *เคลือบผิว plate ด้วย Poly-L-Lysine (MW > 300,000) ก่อนที่จะทำการ seed cell เพื่อให้เซลล์ประสาทยึดเกาะกับผิวของ plate ได้ดี โดยเติม Poly-L-Lysine ความเข้มข้น 50 µg/mL ที่ละลายใน sterile PBS โดยใช้ปริมาตร 50 µL/well สำหรับการ seed ลง 96-well plate นำไปแช่ตู้เย็นทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นดูดสารละลาย Poly-L-Lysine ออก ผึ่งให้แห้งใน BSC II ให้รังสี UV อาบฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที

2.2.2.3 นำเซลล์เข้าตู้บ่มที่ 37˚C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5%CO_2 และความชื้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าเซลล์ P19 เริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทจะสังเกตเห็นว่าเริ่มมีแขนงประสาทยื่นออกมา ดูด P19SM ออกจาก plate จนหมด แล้วเติม P19SM + 10 µM Ara-C ลงไป จากนั้นนำไปเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37˚C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 และความชื้น 10% เป็นเวลาประมาณ 8 วันจะได้เซลล์ประสาทที่สมบูรณ์ เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อไป

2.2.3 การทดสอบฤทธิ์การเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท

2.2.3.1 เตรียมสารละลายของสารที่จะนำมาทดสอบที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น โดยการเจือจางด้วย 10%V/V DMSO เริ่มจากความเข้มข้น 200 µg/ mL และเจือจางลงเรื่อยๆ แบบ 10-folded dilution เพื่อเป็น stock solution

2.2.3.2 เตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับทดสอบ (test sample) โดยการเจือจางจาก stock solution ในแต่ละความเข้มข้น ใน P19SM + 10 µM Ara-C โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 0.5%v/v สารทดสอบจะมีความเข้มข้นลดลงจาก stock solution 20 เท่า

2.2.3.3 เตรียมสารละลายของตัวทำละลาย (DMSO) ใน P19SM + Ara-C ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.5%v/v เพื่อใช้เป็น solvent control

2.2.3.4 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจาก 96-well plate แต่ละหลุมให้หมด เติมสารทดสอบลงไปหลุมละ 150 µL แล้วนำไปบ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5%CO_2 และความชื้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ plate ออกมาจากตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจาก plate แต่ละหลุมให้หมด

2.2.3.5 เติมสารละลาย XTT ที่เตรียมขึ้นโดยเจือจาง XTT dye ใน α-MEM ร้อน (60°C) ให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL และเติม PMS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 µL ลงไปในหลุม หลุมละ 50 µL และเติมสารละลาย XTT ลงไปในหลุมที่ไม่ได้ทำการ seed P19 neuron ไว้ เพื่อใช้เป็น blank นำไปบ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5%CO_2 และความชื้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

2.2.3.6 เมื่อครบเวลานำมาเติม PBS ลงไปหลุมละ 100 µL (ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมคือ 150 µL ซึ่งประกอบด้วย XTT solution ใน PBS) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง มาหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ เปรียบเทียบกับ control คือหลุมที่ไม่มีการเติมสารทดสอบ จากสมการ

$$\% \text{ Cell viability} = [(A_{sample} - A_{blank})/(A_{control} - A_{blank})] \times 100$$

กำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของ control คิดเป็น 100% สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์

2.2.3.7 ทำการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate

จากการทดลองพบว่าความเข้มข้น 1 ng/ml และ 1,000 ng/ml เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของ oxyresveratrol และ dihydrooxyresveratrol ตามลำดับ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาทคือมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% (control) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ดังนั้นในการทดลองลำดับถัดไปเพื่อทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจึงเลือกทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นดังกล่าว

ตารางที่ 2.1 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท P19 เมื่อได้รับสารทดสอบ

สารทดสอบ / **ความเข้มข้น**	**ค่าเฉลี่ยร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท P19 ± SD**				
	1 ng/ml	**10 ng/ml**	**100 ng/ml**	**1000 ng/ml**	**10000 ng/ml**
Oxyresveratrol	115.31±10.50	99.84±4.47	83.64±19.81	80.42±8.76	75.13±10.25
Dihydrooxyresveratrol	67.35±10.11	76.60±29.09	85.78±20.36	115.00±18.50	93.11±14.38

2.2.4 การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทด้วยวิธี serum deprivation

2.2.4.1 เตรียมสารละลายของสารที่จะทดสอบที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุม (มากกว่าร้อยละ 100) และเป็นความเข้มข้นที่ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุมได้มากที่สุด โดยการเจือจางด้วย 10%v/v DMSO เพื่อใช้เป็น stock solution

2.2.4.2 เตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับทดสอบ (test sample) โดยการเจือจางจาก stock solution ใน α-MEM + Ara-C โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 0.5%v/v สารทดสอบจะมีความเข้มข้นลดลงจาก stock solution 20 เท่า

2.2.4.3 เตรียมสารละลายของตัวทำละลาย (DMSO) ใน P19SM + Ara-C และ α-MEM + Ara-C ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.5%v/v เพื่อใช้เป็น solvent control

2.2.4.4 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก 96-well plate แต่ละหลุมให้หมด เติมสารทดสอบลงไปหลุมละ 150 µL แล้วนำไปบ่มที่ 37ºC ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 และความชื้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ plate ออกมาจากตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจาก plate แต่ละหลุม

2.2.4.5 เติมสารละลาย XTT ที่เตรียมขึ้นโดยเจือจาง XTT dye ใน α-MEM ร้อน (60 ºC) ให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL และเติม PMS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25 µL ลงไปในหลุม หลุมละ 50 µL และเติมสารละลาย XTT ลงไปในหลุมที่ไม่ได้ทำการ seed P19 neuron ไว้ เพื่อใช้เป็น blank นำไปบ่มที่ 37ºC ภายใต้บรรยากาศที่มี 5%CO_2 และความชื้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

2.2.4.6 เมื่อครบเวลานำมาเติม PBS ลงไปหลุมละ 100 µL (ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมคือ 150 µL ซึ่งประกอบด้วย XTT solution ใน PBS) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง มาหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ เปรียบเทียบกับ control คือหลุมที่ไม่มีการเติมสารทดสอบ จากสมการ

$$\% \text{ Cell viability} = [(A_{sample} - A_{blank})/(A_{control} - A_{blank})] \times 100$$

กำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของ control คิดเป็น100% สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์

2.2.4.7 ทำการทดสอบ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate)

การวิเคราะห์ข้อมูล:ใช้สถิติการวิเคราะห์โดยวิธี student's *t*-test เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบและกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมซีรัมและไม่ได้รับสารทดสอบ กำหนดค่า $p < 0.05$ จึงจะยอมรับว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อทดสอบกับตัวทำละลายในความเข้มข้นที่ใช้เตรียมสารทดสอบ จะต้องแสดงอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบเกินกว่า ±5% จึงจะยอมรับว่าตัวทำละลายไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท

2.3 การศึกษาศักยภาพของ oxyresveratrol ในป้องกันเซลล์ประสาทจากพิษที่เกิดจาก dexamethasone

วิธีดำเนินการทดลองนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Leskiewicz และคณะ [15]

2.3.1 การทดลองหาสภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ประสาท

ทำการเลี้ยงเซลล์ประสาท SH-SY5Y (ATCC) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM-F12 ที่มีการผสม 15% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine และ 100 units/ml ของ penicillin/streptomycin ในตู้เลี้ยงเซลล์ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 ºC พบว่าเซลล์เจริญเติบโตในอาหารและสภาวะดังกล่าวได้ดี

2.3.2 การหาความเข้มข้นของ oxyresveratrol ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท

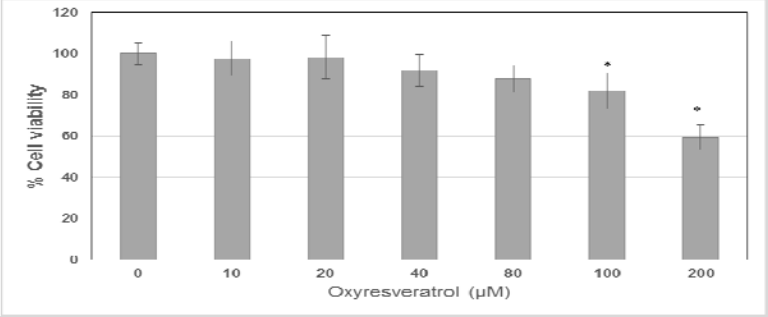
2.3.2.1 เลี้ยงเซลล์ SH-SY5Y ใน 96-well plate จำนวน 15,000 เซลล์/หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 ºC

2.3.2.2 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ใส่สารละลาย oxyresveratrol ใน DMSO ที่ความเข้มข้นต่างๆ (โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO 0.1% V/ V) และเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.2.3 ดูดเอาสารละลาย oxyresveratrol ออก และใส่ MTT 500 µg บ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวออก และใส่ 100 µl ของ DMSO เพื่อละลายผลึก formazan ที่ได้จากปฏิกิริยา แล้ววัดความเข้มข้นของสารละลาย formazan ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm

2.3.2.4 คำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ โดยการเปรียบเทียบค่าของเซลล์ที่ได้รับสาร oxyresveratrol กับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร

จากการทดลองพบว่า oxyresveratrol ที่ความเข้มข้น 10-80 µM ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท SH-SY5Y เมื่อทดสอบกับเซลล์ดังกล่าวเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่จะเริ่มเห็นความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น oxyresveratrol ตั้งแต่ 100 µM (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1: อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท SH-SY5Y เมื่อได้รับ

2.3.3 การหาความเข้มข้นของ dexamethasone ที่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท

2.3.3.1 เลี้ยงเซลล์ SH-SY5Y ใน 96-well plate จำนวน 15,000 เซลล์/หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 ºC

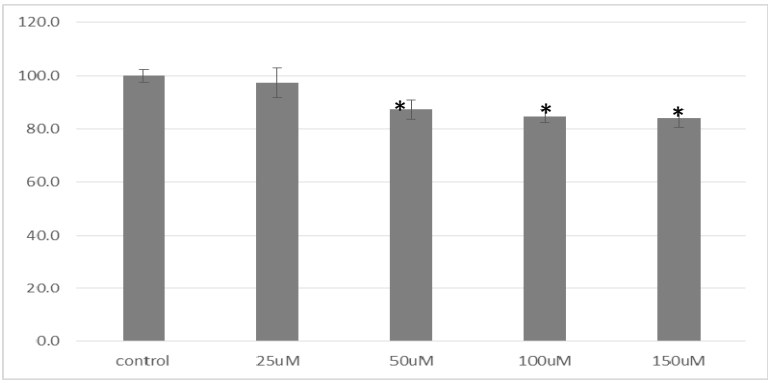
2.3.3.2 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยใช้ 10% charcoal stripped fetal bovine serum in DMEM/f12

2.3.3.3 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ใส่สาร dexamethasone ใน DMSO ที่ความเข้มข้น 25-150 µM (final concentration ของ DMSO เท่ากับ 0.1% v/v) และเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

2.3.3.4 เมื่อครบ 96 ชั่วโมง นำสารทดสอบออกและใส่ MTT 500 µg/ml บ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวออก และใส่ 100 µl ของ DMSO เพื่อละลายผลึก formazan ที่ได้จากปฏิกิริยา จากนั้นวัดความเข้มข้นของสารละลาย formazan ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm

2.3.3.5 คำนวณอัตราการรอดของเซลล์โดยการเปรียบเทียบค่าของเซลล์ที่ได้รับสารกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร

จากผลการทดลอง พบว่า dexamethasone ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 µM ขึ้นไปแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (รูปที่ 2.2) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงใช้ dexamethasone ที่ความเข้มข้น 100 และ 50 µM เหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาท



รูปที่ 2.2: อัตราการรอดของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร dexamethasone 25–150 µM

*แตกต่างจากกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p <0.05)

2.3.4 การตรวจวัดฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของ dexamethasone

2.3.4.1 Co-treatment (dexamethasone 100 µM)

ทำการทดลองในทำนองเดียวกับข้อ 2.3.3.1 ถึง ข้อ 2.3.3.5 แต่หลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทำนองเดียวกับข้อ 2.3.3.2 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เติมสารผสมของ dexamethasone และ oxyresveratrol ซึ่งประกอบด้วย dexamethasone 100 µM และ oxyresveratrol 10-40 µM

2.3.4.2 Pre-treatment (dexamethasone 100 µM)

ทำการทดลองในทำนองเดียวกับข้อ 2.3.3.1 ถึง ข้อ 2.3.3.5 แต่หลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทำนองเดียวกับข้อ 2.2.3.2 แล้วเติม oxyresveratrol 10-40 µM บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อน แล้วจึงเติมสาร dexamethasone 100 µM

2.3.4.3 Pre-treatment (dexamethasone 50 µM)

ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.3.4.2 แต่ลดความเข้มข้นของสาร dexamethasone เป็น 50 µM

บทที่ 3
ผลการทดลอง การอภิปรายและสรุปผล

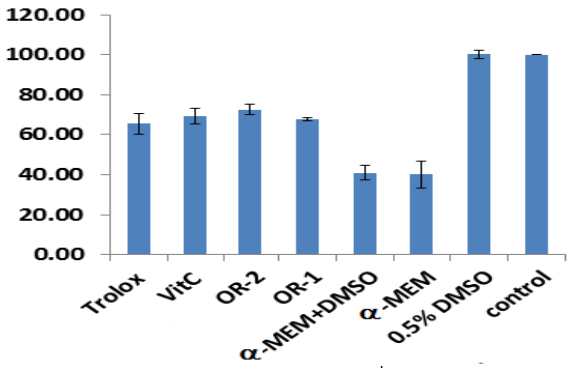
3.1 การปกป้องเซลล์ประสาทจากสภาวะ serum deprivation

ผลการทดลอง (ตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.1) แสดงว่า oxyresveratrol (OR-1) ในขนาด 1 ng/ml และ dihydrooxyresveratrol (OR-2) ในขนาด 1,000 ng/ml สามารถปกป้องเซลล์ประสาท P19 จากพิษที่เกิดจากสภาวะ serum deprivation ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ toxic control

ตารางที่ 3.1 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท P19 ในสภาวะขาดอาหารซีรัม

สารทดสอบ	ค่าเฉลี่ยร้อยละอัตราการรอดชีวิต ± SD
Oxyresveratrol (OR-1) 1 ng/ml	67.60 ± 0.91*
Dihydrooxyresveratrol (OR-2) 1000 ng/ml	72.62 ± 2.39*
Trolox 15 μg/ml (positive control)	65.42 ± 5.25*
Vitamin C 10 μg/ml (positive control)	69.27 ± 3.77*
α-MEM + 10 μM Ara-C + 0.5%DMSO (solvent control of toxic condition)	40.98 ± 3.63
α-MEM + 10 μM Ara-C (toxic condition)	40.15 ± 6.82
P19SM+ 10 μM Ara-C +0.5%DMSO (solvent control)	100.11 ± 1.91
P19SM + 10 μM Ara-C (control)	100.00 ± 0.00

* $p < 0.05$ เทียบกับ toxic control

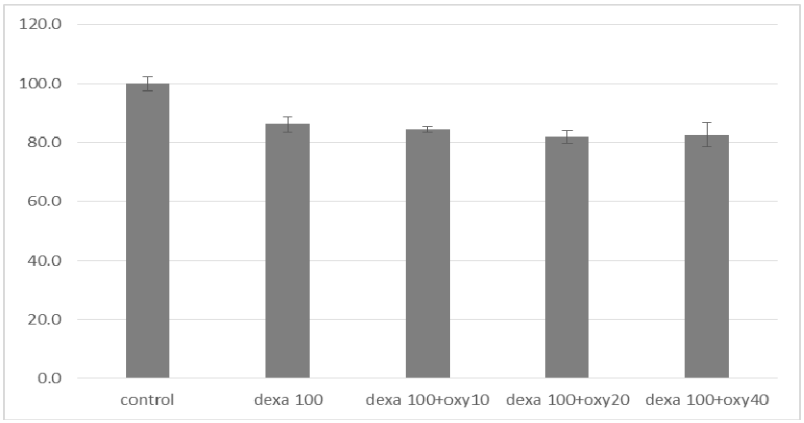


รูปที่ 3.1: อัตราการรอดของเซลล์ P19 เมื่อได้รับสาร

3.2 การปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของ dexamethasone

3.2.1 Co-treatment (dexamethasone 100 μM)

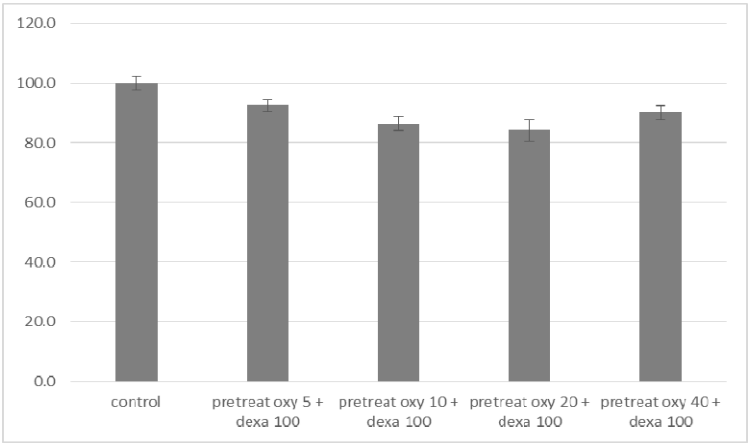
ผลการทดลอง (รูปที่ 3.2) แสดงว่า oxyresveratrol ที่ความเข้มข้น 10-40 μM ไม่สามารถยับยั้งปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของ dexamethasone ในขนาด 100 μM ได้



รูปที่ 3.2: อัตราการรอดของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร dexamethasone 100 μM พร้อมกับ oxvresveratrol 10-40 uM

3.2.2 Pre-treatment (dexamethasone 100 μM)

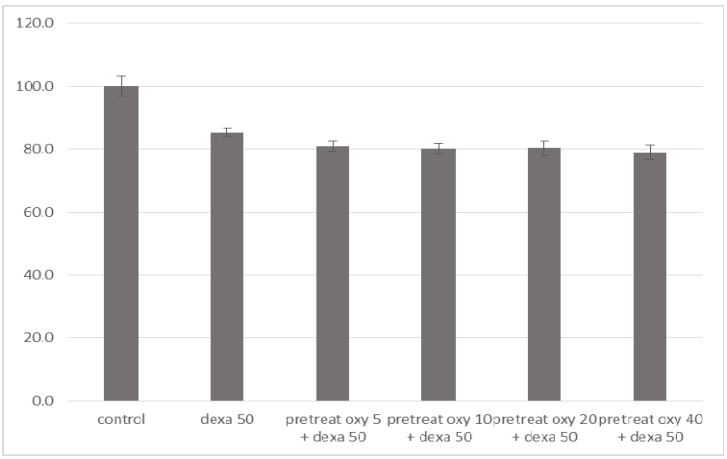
ผลการทดลอง (รูปที่ 3.3) แสดงว่าสาร oxyresveratrol ที่ความเข้มข้น 5-40 μM ก่อนการให้สาร dexamethasone ในขนาด 100 μM ไม่สามารถปกป้องเซลล์จากพิษของ dexamethasone ได้



รูปที่ 3.3: อัตราการรอดของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร dexamethasone 100 μM หลังจากได้รับ oxyresveratrol 5-40 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.3 Pre-treatment (dexamethasone 50 μM)

ผลการทดลอง (รูปที่ 3.4) แสดงว่าการให้ oxyresveratrol ที่ความเข้มข้น 5-40 μM ก่อนการให้ dexamethasone ขนาด 50 μM ไม่สามารถปกป้องเซลล์จากพิษของ dexamethasone ได้



รูปที่ 3.4: อัตราการรอดของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสาร dexamethasone 50 μM หลังจากได้รับสาร oxyresveratrol 5-40 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

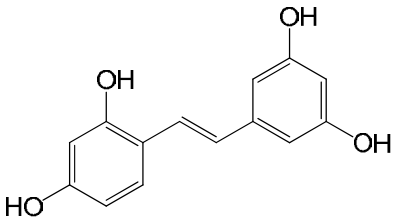
อภิปรายผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้ใช้แบบจำลอง 2 แบบ ในการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective) ของ oxyresveratrol ในแบบจำลองแรกใช้เซลล์เพาะเลี้ยง P19 ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วยการงด FBS ในอาหาร ส่วนในแบบจำลองที่สอง ใช้เซลล์ SH-SY5Y ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วย dexamethasone

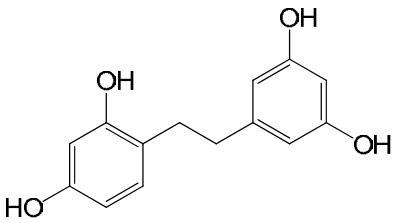
ในการทดลองแรก เซลล์เพาะเลี้ยง P19 ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะพิษด้วยการงด FBS ในอาหาร การตรวจวัดศักยภาพของสารทดสอบ oxyresveratrol ในการปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษที่เกิดขึ้นทำโดยการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากที่อยู่ในสภาวะพิษและได้รับสารทดสอบด้วยวิธี XTT assay ในการทดลองนี้ใช้สาร positive controls จำนวน 2 สาร คือ Trolox ขนาด 15 μg/ml และ Vitamin C ขนาด 10 μg/ml ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.1 ทั้งนี้ได้วิเคราะห์ผลในทางสถิติโดยใช้ Student's *t* test พบว่า oxyresveratrol (OR-1) ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท P19 (67.60 %) ซึ่งมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทใน toxic condition (40.15 %) และ ใน solvent control of toxic condition (40.98 %) และเมื่อเปรียบเทียบกับสาร positive controls ทั้งสอง ก็จะเห็นได้ว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทสูงกว่า Trolox และ vitamin C เพราะทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท P19 ใกล้เคียงกับ Trolox (65.42 %) และ vitamin C (69.27 %) แต่ขนาด (w/v) ของ oxyresveratrol ในการทดลองนี้มีค่าเพียง $\leq$ 1/1000 เท่าของสาร positive controls ทั้งสอง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานฤทธิ์ของ oxyresveratrol .ในการปกป้องเซลล์ประสาทอื่นๆ ที่มีมาก่อนหน้านี้ [10-12]

เนื่องจากจากผลการทดลองข้างต้นชี้ว่า oxyresveratrol มีศักยภาพในการปกป้องเซลล์ประสาท P19 จากสภาวะพิษที่เกิดจากการขาดอาหารซีรัม คณะผู้วิจัยจึงได้สนใจที่จะศึกษาเพิ่มเติมในสารอนุพันธ์ของ oxyresveratrol คือ

dihydrooxyresveratrol (OR-2) ซึ่งเตรียมได้จากการทำปฏิกริยา hydrogenation เพื่อตรวจวัดศักยภาพของสารนี้ในการปกป้องเซลล์ประสาท P19 ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ขนาดสูงสุดของสที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์คือ 1,000 ng/ml จึงได้ทำการศึกษาต่อไปโดยให้ dihydrooxyresveratrol ในขนาด 1,000 ng/ml แก่เซลล์ พบว่าสารนี้ในขนาดดังกล่าวสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากสภาวะพิษจากการงดอาหารซีรัมได้ โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 72.62 % อย่างไรก็ตามน้ำหนักของสารอนุพันธ์นี้ ที่ใช้คิดเป็นประมาณ 1,000 เท่าของ oxyresveratrol ดังนั้นจึงถือว่า dihydrooxyresveratrol มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์อ่อนกว่า oxyresveratrol



oxyresveratrol



dehydrooxyresveratrol

การเลี้ยงเซลล์ในสภาวะขาดอาหารซีรัม (serum deprivation) จะทำให้เกิด oxidative stress ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ตาย [18] เป็นที่ทราบว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ antioxidant สูง ดังนั้นการที่ oxyresveratrol สามารถปกป้องเซลล์จากสภาวะพิษจากการขาดอาหาร จึงน่าจะมาจากฤทธิ์ antioxidant นั่นเอง ส่วนการที่ dihydrooxyresveratrol ที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทอ่อนกว่า oxyresveratrol คงเป็นเพราะฤทธิ์ antioxidant ที่อ่อนกว่าเนื่องจากโครงสร้างไม่มีพันธะคู่เชื่อมระหว่าง aromatic rings ทำให้ conjugation หายไป ไม่มี electron delocalization ระหว่าง aromatic rings

ในการทดลองที่สอง ได้ทำในเซลล์ประสาท SH-SY5Y ใช้สาร dexamethasone เหนี่ยวนำให้เกิดพิษ แล้วตรวจวัดศักยภาพของสารทดสอบ oxyresveratrol ในการปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษที่เกิดขึ้น โดยวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากที่ได้รับสารพิษและสารทดสอบด้วยวิธี MTT assay ได้ทำการทดลองทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง ในการทดลองชุดแรกใช้ dexamethasone ในขนาด 100 μM เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาท พร้อมกับการให้ oxyresveratrol ในขนาด 10-40 μM พบว่า oxyresveratrol ในขนาดดังกล่าว ไม่สามารถป้องกันเซลล์ประสาทจากพิษของ dexamethasone ได้ (รูปที่ 3.2) ในการทดลองชุดที่สองได้เปลี่ยนวิธีการให้ยา โดยให้ oxyresveratrol ในขนาด 5-40 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนแล้วจึงให้ dexamethasone ขนาด 100 μM พบว่า oxyresveratrol ในขนาดดังกล่าวไม่สามารถป้องกันพิษต่อเซลล์ประสาทได้ (รูปที่ 3.3) ในการทดลองชุดสุดท้ายได้ให้ oxyresveratrol ในขนาด 5-40 μM ก่อนการให้dexamethasone ขนาด 50 μM พบว่าแม้ว่าจะลดขนาด dexamethasone ลงครึ่งหนึ่ง oxyresveratrol ในขนาดดังกล่าวก็ไม่สามารถป้องกันเซลล์จากพิษของ dexamethasone ได้ (รูปที่ 3.4) แม้ว่าเป็นที่ทราบกันว่า dexamethasone ทำให้เซลล์ตาย โดยเกี่ยวข้องกับกลไก oxidative stress [19] ทำนองเดียวกับที่เกิดขึ้นในสภาวะ serum deprivation ก็ตาม แต่ผลการทดลองในเซลล์ SH-SY5Y ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในสภาวะการทดลองข้างต้น oxyresveratrol ไม่สามารถปกป้องเซลล์จากสภาวะ oxidative stress ได้ เราอาจตั้งข้อสันนิษฐานเบื้องต้นเพื่ออธิบายผลการทดลองได้หลายทาง เช่นในสภาวะการทดลองดังกล่าว ชนิดของ reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำโดย dexamethasone อาจมีโครงสร้างที่ไม่เหมาะที่ oxyresveratrol จะจับไว้ได้ หรือปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นมีมากเกินกว่าที่ oxyresveratrol จะจับได้หมด หรือ dexamethasone อาจทำให้เซลล์ตายโดยมีกลไกอื่นๆ ที่สำคัญแต่ไม่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress ร่วมอยู่ด้วย อย่างไรก็

ตามจากข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ ยังไม่เพียงพอที่นำมาสรุปสาเหตุที่แท้จริงได้ ยังคงต้องทำการทดลองอื่นๆ เพิ่มเติม เพื่อให้ได้หลักฐานมาสนับสนุนข้อสันนิษฐานเหล่านี้

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองในโครงการชี้เห็นว่า oxyresveratrol มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท P19 ในสภาวะ oxidative stress ที่เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดยการงดอาหารซีรัม (serum deprivation) แต่ไม่สามารถปกป้องเซลล์ SH-SY5Y จากพิษของ dexamethasone ในสภาวะการทดลองที่กำหนด

นอกจากนี้ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมไปจากที่ได้เสนอไว้ คือได้เตรียมอนุพันธ์ของ oxyresveratrol ซึ่งได้แก่ dihydrooxyresveratrol แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท P19 แต่พบว่า dihydrooxyresveratrol มีฤทธิ์อ่อนกว่า oxyresveratrol

ข้อมูลฤทธิ์ปกป้องเซลล์ P19 ของ oxyresveratrol ที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นองค์ความรู้ใหม่ ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานอื่นที่มีมาก่อน ผลการวิจัยนี้เป็นประโยชน์สำหรับการนำไปใช้เป็นแนวทางการพัฒนาพืชสมุนไพรที่มี oxyresveratrol เป็นสารสำคัญ เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับการป้องกันหรือบรรเทาการเสื่อมของเซลล์ประสาทเช่น โรคความจำเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ (Alzhiemer’s disease) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson’s disease)

อนึ่งการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับฤทธิ์ของสาร oxyresveratrol ในการป้องกันโรคความจำเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ (Alzhiemer’s disease) นั้น ขณะนี้ผู้วิจัยได้มีโครงการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อศึกษาศักยภาพของสารนี้ในสัตว์ทดลอง ขณะนี้ได้ข้อมูลเบื้องต้นซึ่งผลเป็นที่น่าพอใจ คาดว่าจะทำการทดลองแล้วเสร็จและสรุปผลการวิจัยได้ในเวลาอันควร

บรรณานุกรม

[1] Mongolsuk, S., Robertson, A. and Towers, R. 2,4,3′,5′-Tetrahydroxystilbene from *Artocarpus lakoocha* . Journal Chemical Society 2231–2233 (1957).

[2] Chung, K.-O., Kim, B.-Y., Lee, M.-H., Kim, Y.-R., Chung, H.-Y., Park, J.-H. and Moon J.-O. In-vitro and in-vivo anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. UUUJournal of Pharmacy and Pharmacology **55**, 1695-1700 (2003).

[3] Likhitwitayawuid, K., Sornsute, A., Sritularak, B. and Ploypradith, P. Chemical transformations of oxyresveratrol (*trans*-2,4,3′,5′-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **16**, 5650-5653 (2006).

[4] Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K., Pheansri, I. and Likhitwitayawuid, K. *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the in vitro anti-tyrosinase and in vivo skin whitening activities. International Journal of Cosmetic Science **28**, 269-276 (2006).

[5] Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., Benchanak, K., Lipipun, V., Mathew, J., and Schinazi, R.F. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. Natural Product Research **19**, 177-182 (2005).

[6] Lipipun, V., Sasivimolphan, P., Yoshida, Y., Daikoku, T., Sritularak, B., Ritthidej, G., Likhitwitayawuid, K., Pramyothin, P., Hattori, M. and Shiraki, K.[PP]Topical cream-based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice. Antiviral Research **91**, 154-160 (2011).

[7] Lorenz, P., Roychowdhury, S., Engelmann, M., Wolf, G. and Horn, T.F.W. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. Nitric Oxide **9**, 64–76 (2003).

[8] Aftab, N., Likhitwitayawuid, K. and Vieira, A. Comparative antioxidant activities and synergism of resveratrol and oxyresveratrol. UNatural Product Research **24**, 1726-1733 (2010).

[9] Chatsumpun, M., Chuanasa, T., Sritularak, B. and Likhitwitayawuid, K. Oxyresveratrol protects against DNA damage induced by photosensitized riboflavin. Natural Product Communications **6**, 41-44 (2011).

[10] Andrabi, S. A., Spina, M. G., Lorenz, P., Ebmeyer, U., Wolf, G. and Horn, T.F.W. Oxyresveratrol (*trans*-2,3′,4,5′-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. Brain Research **1017**, 98–107 (2004).

[11] Ban, J.-Y., Jeon, S.-Y., Nguyen, T.T.H., Bae, K.-H., Song, K.-S. and Seong, Y.-H. Neuroprotective Effect of Oxyresveratrol from *Smilacis Chinae* Rhizome on Amyloid β Protein (25—35)-Induced Neurotoxicity in Cultured Rat Cortical Neurons Biological and Pharmaceutical Bulletin **29**, 2419-2424 (2006).

[12] Jeon, S -Y., Kwon, S.-H., Seong, Y.-H., Bae, K., Hur, J.-M., Lee,Y.-Y., Suh, D.-Y. and Song K.-S. β-secretase (BACE1)-inhibiting stilbenoids from Smilax Rhizoma. Phytomedicine **14**, 403–408 (2007).

[13] Breuer, C., Wolf, G., Andrabi, S.A. Lorenz, P. and Horn, T.F.W. Blood–brain barrier permeability to the neuroprotectant oxyresveratrol. Neuroscience Letters **393**, 113–118 (2006).

[14] Chao, J., Yu, M.-S., Ho, Y.-S., Wang, M. and Chang, R. C.-C. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity. Free Radical Biology & Medicine **45**, 1019–1026 (2008).

[15] Leskiewicz, M., Jantas, D., Regulska, M., Kaczanowska, J., Basta-Kaim, A., Budziszewska, B., Kubera, M. and Lason, W. Antidepressants attenuate the dexamethasone-induced decrease in viability and proliferation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells: A involvement of extracellular regulated kinase (ERK1/2). Neurochemistry International **63**, 354-362 (2013).

[16] MacPherson, P.A. and McBurney, M.W. P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultured neurons amenable to genetic manipulation. Methods **7**, 238-252 (1995).

[17] Tadtong, S., Kanlayavattanakul. M. and Lourith. N. Neuritogenic and neuroprotective activities of fruit residues. Natural Product Communications **8**, 1583-1586 (2013).

[18] Bai, J. and Cederbaum, A.I. Cycloheximide protects HepG2 cells from serum withdrawal-induced apoptosis by decreasing p53 and phosphorylated p53 levels. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **319**, 1435-1443 (2006).

[19] You, J.M., Yun, S.J., Nam, K.N., Kang, C., Won. R. and Lee, E.H. Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **87**, 440-447 (2009).

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายกิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Kittisak Likhitwitayawuid
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3101500418432
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์
4. หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
   คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   โทรศัพท์: 02-21888360
   E-mail: Kittisak.L@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	เภสัชศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 1)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2524
ปริญญาโท	Natural Products Chemistry	Chiba University	พ.ศ. 2529
ปริญญาเอก	Pharmacognosy	University of Illinois at Chicago	พ.ศ. 2535

ผู้ร่วมวิจัย (1)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายบุญชู ศรีตุลารักษ์
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Boonchoo Sritularak
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3839900268081
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
   คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   โทรศัพท์: 02-21888356, 081-8547016
   E-mail: Boonchoo.Sr@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	พ.ศ. 2539
ปริญญาโท	เภสัชเวท	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2542
ปริญญาเอก	เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2546

ผู้ร่วมวิจัย (2)

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายปิติ จันทร์วรโชติ

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Pithi Chanvorachote

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3100800171202

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา

   คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   โทรศัพท์...02-2188344, 0812075039

   E-mail: pithi_chan@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	เภสัชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2545
ปริญญาเอก	Pharmaceutical Technology	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ. 2549