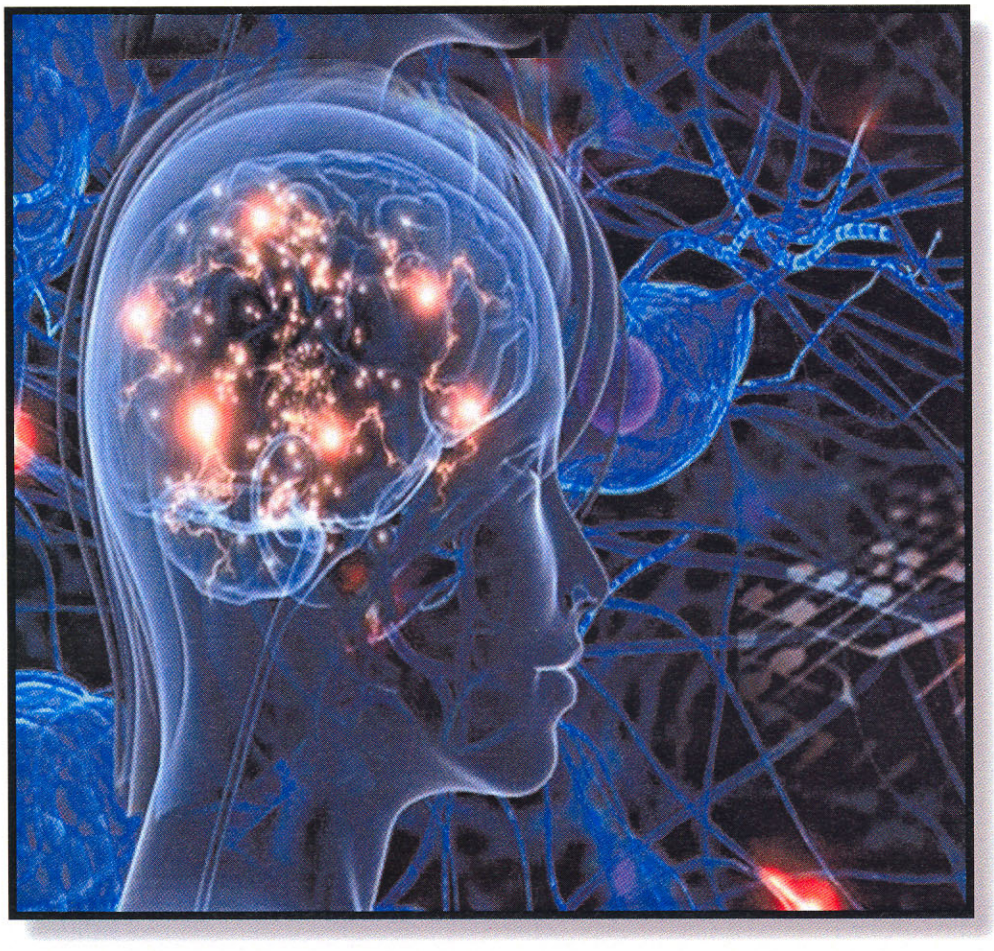
โครงการวิจัยที่ ภ. 54-05 / ย. 7 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

วิจัยพัฒนาการผลิตสารสกัดปรับมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทอัตโนมัติ



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 54-05
การวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตสารสกัดปรับมาตรฐานจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
ระดับกึ่งอุตสาหกรรม

โครงการย่อยที่ 7
วิจัยพัฒนาการผลิตสารสกัดปรับมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทอัตโนมัติ

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
วิจัยพัฒนาการผลิตสารสกัดปรับมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทอัตโนมัติ

โดย
ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูร
อมรรัตน์ ขยันการนาวี **พงศธร หลิมศิริวงษ์**
อุบล ฤกษ์อ่ำ **ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล**

บรรณาธิการ วว., ปทุมธานี 2558
นฤมล รื่นไวย์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
ศิริสุข ศรีสุข

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นายยงวุฒิ เสาวพฤกษ์)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ในการสนับสนุนงบประมาณ และสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ สำหรับการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งขอขอบคุณนางสาวชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล ผู้อำนวยการฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ที่ให้การสนับสนุน และคำปรึกษาในการดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี.

นอกจากนี้ขอขอบคุณ นางสาวเตือนตา เสมาทอง, นายภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา, นางเพ็ญใจ เสมาทอง และคณะผู้ร่วมดำเนินการวิจัยทุกท่าน ซึ่งล้วนเป็นบุคลากรฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและช่วยดำเนินการวิจัยนี้.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	ง
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	6
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	11
4. สรุปผลการทดลอง	17
5. ข้อเสนอแนะ	19
6. เอกสารอ้างอิง	22

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง 12

ตารางที่ 2. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลต่ำกว่าปกติ (Low glucose :glucose toxicity: 1.1 mmol/L) 13

ตารางที่ 3. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติ (High glucose :glucose toxicity: 150 mmol/L) 15

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง 11

รูปที่ 2. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลต่ำกว่าปกติ (Low glucose :glucose toxicity: 1.1 mmol/L) 14

รูปที่ 3. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติ (High glucose: glucose toxicity: 150 mmol/L) 16

RESEARCH AND DEVELOPMENT ON PRODUCTION OF STANDARDIZE BIOACTIVE EXTRACTS IN AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM

Sarunya Laovitthayanggoon, Amonrat Khayungarnnawee, Pongsatorn Limsiriwong, Ubon Rerk-am and Chuleratana Banchonglikitkul.

ABSTRACT

A study on cytoprotection or neuroprotection in an *in vitro* model of diabetes neuropathy of herbal extracts using PC12-AC which is pheochromocytoma (PC12) cell lines were differentiated by Nerve Growth Factor (NGF). These cell lines were then measured on the survival rate from glucose toxicity at low (1.1mmol/L) and high (150 mmol/L) concentration levels and mulberry (*Morus alba* Linn.) leave extract after 96 hours exposure. The result revealed that at low glucose level with varied concentration of mulberry leave extract at 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/ml, the survival rate could be significantly increased ($p<0.05$) at the percentage of 84.21 ± 1.23, 84.91 ± 1.15, 95.16 ± 0.99 and 98.67 ± 1.23 % respectively in comparison with positive control (vehicle + low glucose). Meanwhile, the study of mulberry leave extract at doses of 0.25, 0.5 and 0.75 mg/ml in the high glucose level (150 mmol/L) showed that the survival rate was increased significantly ($p<0.05$) at 67.18 ± 0.98% , 73.12 ± 0.23% and 74.86 ± 0.89%, respectively. These results indicated that mulberry leave extract showed a potential as the protective effect at the range of concentration of 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/ml on both glucose concentration levels.

In conclusion, the mulberry leave extract has a potential to be used in diabetes neuropathy treatment. However, further studied of the effect of blood sugar reduction in both an animal model and a clinical trial are needed.

วิจัยและพัฒนาการผลิตสารสกัดปรับมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทอัตโนมัติ

ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูร[1], อมรรัตน์ ขยันการนาวี[1], พงศธร หลิมศิริวงษ์[1], อุบล ฤกษ์อ่ำ[1] และ ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพร โดยทดสอบผลการปกป้องเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง PC12-AC (ชนิด Pheochromocytoma (PC12) ที่ได้รับการกระตุ้นหรือ differentiate ด้วย Nerve growth factor) ที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ประสาทอัตโนมัติ ถูกทำลาย และยับยั้งการเจริญเติบโต จากระดับผิดปกติของน้ำตาลกลูโคส (Cytoprotective effect on glucose level หรือ neuroprotective effect) ดำเนินการเพาะเลี้ยงเซลล์ PC12-AC บนจานเพาะเลี้ยงเพื่อดูการตอบสนองต่อระดับน้ำตาลในปริมาณที่สูงและต่ำกว่าปกตินาน 96 ชั่วโมง ผลการทดสอบ พบว่าภายใต้สภาวะน้ำตาลที่ต่ำกว่าปกติ (1.1 มิลลิโมลต่อลิตร) สารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถช่วยให้การรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังนี้ คือ ร้อยละ 84.21 ± 1.23, 84.91 ± 1.15, 95.16 ± 0.99 และ 98.67 ± 1.23 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบหม่อนที่ 0.25, 0.5 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากขึ้นจากกลุ่มควบคุม (Vehicle + High glucose) ดังนี้คือ ร้อยละ 67.18 ± 0.98, 73.12 ± 0.23 และ 74.86 ± 0.89 ตามลำดับ. ในสภาวะน้ำตาลที่สูงกว่าปกติ (150 มิลลิโมลต่อลิตร) ผลการทดลองบ่งชี้ว่าสารสกัดใบหม่อนมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์จากการถูกทำลายด้วยระดับน้ำตาลทั้ง 2 ระดับ ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$).

สรุปผลจากการทดลองครั้งนี้สารสกัดใบหม่อนมีศักยภาพเบื้องต้นในการต้านโรคเบาหวาน อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาผลเพิ่มเติมในการลดระดับน้ำตาลในเลือดสัตว์ทดลองหรือทางคลินิกต่อไป.

---

[1]ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1. บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พืชสมุนไพร เป็นสิ่งที่อยู่คู่คนไทยมานาน แต่เมื่อการแพทย์แผนปัจจุบันเริ่มเข้ามามีบทบาทในประเทศ สรรพคุณและคุณค่าของสมุนไพรอันเป็นสิ่งที่เรียกได้ว่าภูมิปัญญาโบราณก็เริ่มถูกลดความสำคัญไปเรื่อยๆ จนพืชสมุนไพรหลายชนิดต้องสูญพันธ์ไปในที่สุด เป็นที่ทราบกันว่า สมุนไพรไทยเป็นสิ่งที่มีคุณค่าใช้ประโยชน์ได้จริง และใช้ได้อย่างกว้างขวาง คนไทยใช้สมุนไพรบำบัดรักษาโรค, ใช้เป็นอาหารและเครื่องประทินผิวกันมานานตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน อีกทั้งประเทศไทยยังมีความหลากหลายของพันธุ์พืช และภูมิปัญญาของบรรพบุรุษไทยตกทอดกันมา ในปัจจุบันวิวัฒนาการของเทคโนโลยีต่างๆ ประกอบกับการศึกษาวิจัยของมนุษย์ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ตอบสนองความต้องการมากขึ้น ส่งผลให้ประชาชนทั่วไป, หน่วยงานของรัฐ และหน่วยงานเอกชน หันมาสนใจใช้ประโยชน์จากสมุนไพรกันมากขึ้นเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันนี้ มีการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการสกัดให้ได้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น สารฟินอลิก (phenolics) หรือพอลิฟินอล (polyphenol), สารซาโปนิน, สารเพปไทด์ และสารกลุ่มพอลิแซ็กคาไลด์ เป็นต้น โดยที่สารต่างๆ เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด.

นอกจากนี้ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดโดยทำการทดสอบกับเซลล์เป้าหมายที่แยกได้จากเซลล์มนุษย์ หรือจากสัตว์ เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นพิษของสารสกัดในเบื้องต้นก่อนนำไปทำการทดสอบในสัตว์ทดลองต่อไป ทั้งนี้ ประโยชน์ที่ได้จะสามารถลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลอง และสารทดสอบ รวมทั้งสามารถทดสอบสารตัวอย่างหลายชนิดในครั้งเดียวกัน.

ทั้งนี้ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ได้จัดตั้งโครงการ “วิจัยพัฒนาการผลิตสารสกัดปรับมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทอัตโนมัติ” ขึ้นภายใต้ชุดโครงการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตสารสกัดปรับมาตรฐานจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติระดับอุตสาหกรรม เพื่อทำการคัดเลือก สารสกัดพืชภายใต้โครงการชุด เพื่อดำเนินการศึกษาการออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทอัตโนมัติในหนูทดลองและพัฒนาสารสกัดเหล่านั้นไปสู่ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ, ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร, เครื่องสำอาง หรือยาจากสมุนไพรต่อไป (โดยโครงการนี้ไม่มีวัตถุประสงค์ในการผลิตสารสกัดตามชื่อโครงการแต่อย่างใด ผิดพลาดจากการพิมพ์ชื่อโครงการผิด).

แต่เนื่องจากเครื่องมือสำหรับการทดลองขาดความพร้อมในปีแรกประกอบกับประสบกับเหตุการณ์อุทกภัยครั้งยิ่งใหญ่ทำให้ไม่สามารถดำเนินการทดสอบได้ พออย่างเข้าสู่ปีที่สองหัวหน้าโครงการดังกล่าวเดินทางไปศึกษาต่อต่างประเทศ จึงขอเปลี่ยนแปลงวิธีการศึกษาผลของสารสกัดต่อระบบประสาทอัตโนมัติเป็นวิธีการศึกษาผลต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงแทน.

1.2 วรรณกรรม แนวความคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารตัวอย่าง ต่อร่างกายทั้งทางชีววิทยาและทางสรีรวิทยา จะหมายรวมถึงกลไกการออกฤทธิ์, การดูดซึม, การกระจายตัว, การเปลี่ยนแปลงของสารในร่างกาย และการขับถ่ายออกจากร่างกาย ดังนั้น การศึกษาผลต่อการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ (Electrophysiological measurement of autonomic nerve activity) เป็นเทคนิคหนึ่งในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั้งการออกฤทธิ์ทางตรงและทางอ้อม การออกฤทธิ์ทางตรงพิจารณาจากผลการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติที่ไปควบคุมการทำงานของอวัยวะและเนื้อเยื่อเป้าหมาย ซึ่งอวัยวะและเนื้อเยื่อนั้นจะถูกกระตุ้นได้โดยการฉีด, การทา, การสูดดมหรือการป้อนสารทดสอบต่างๆ ให้กับสัตว์ทดลองและวัดการตอบสนองต่อการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ เพื่อทราบว่าสารทดสอบมีผลต่อระบบใดในร่างกาย. สำหรับการศึกษาผลทางอ้อมในหลอดทดลอง (*In-vitro*) โดยการทดสอบผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีต้นกำเนิดมาจากปมประสาทอัตโนมัติของ sympathetic nervous system ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าการเกิดพยาธิสภาพของเซลล์ประสาทจะมีสาเหตุทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Pheochromocytoma (PC12) ซึ่งเป็นเซลล์เนื้องอกที่เจริญในเซลล์ chromaffin นอกต่อมหมวกไตของหนูที่หลั่งสารสื่อประสาท catecholamine จำนวนสูงกว่าปกติ โดย PC12 cell line นั้นได้รับการยอมรับว่าสามารถนำมาใช้ศึกษาเกี่ยวกับระบบประสาทอัตโนมัติ, การขาดเลือดในสมอง, การทำงานที่ผิดปกติของระบบประสาท และโรคเบาหวาน.

นอกจากนี้ นักเภสัชวิทยา พบว่า การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับผลกระทบต่อระดับการขนส่งกลูโคสในระบบประสาท (neuronal glucose transporters) และยังพบอีกว่าการตอบสนองของ PC12 ต่อ agonist และ antagonist ต่อ D1 และ D2 dopamine receptor เช่น การกระตุ้น Ca2+ influx โดย ATP (Inoue *et al.* 1992), voltage-gated K+ current (Nakazawa *et al*. 1995) และการหลั่ง dopamine (Courtney *et al.* 1991), ส่วนเซลล์ PC12 ที่ได้รับการกระตุ้น หรือ differentiate ด้วย Nerve growth factor ยังสามารถใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาความผิดปกติของเซลล์ในระบบประสาทอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาความผิดปกติของเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้อง

กับระดับน้ำตาลกลูโคส (Cytoprotective effect on glucose level หรือ neuroprotective effect) ซึ่งจากข้อมูลก่อนหน้านี้ พบว่า การศึกษาในลักษณะนี้จักเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับระดับน้ำตาลในเลือด.

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำเซลล์ PC12 มาใช้ในการทดสอบ เพื่อดูผลในการปกป้องการถูกทำลายและการเจริญเติบโตของ PC12 (เซลล์เพาะเลี้ยง) โดยการทดสอบนี้จะดำเนินการเพาะเลี้ยงเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเพื่อดูการตอบสนองต่อระดับน้ำตาลในปริมาณที่แตกต่างกัน ผลจากการทดสอบจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาหาสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการลดระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งจะได้ดำเนินการพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สำหรับผู้ป่วยเบาหวานในอนาคต.

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสมุนไพร โดยใช้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง PC12-AC ดูผลการออกฤทธิ์ป้องกันเซลล์ถูกทำลายในภาวะที่มีระดับน้ำตาลต่ำและสูงกว่าปกติ.
2. เพื่อใช้วิธีการทดสอบจากการใช้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง PC12-AC ในการสำรวจสารสกัดที่ออกฤทธิ์ป้องกันโรคเบาหวานและสำหรับการให้บริการทดสอบต่อไปในอนาคต.

1.4 ขอบเขตการศึกษา

การวิจัยเรื่องนี้ได้กำหนดขอบเขตของการศึกษาไว้ ดังนี้

1. ดำเนินการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท PC 12-AC ในเพลต 96 หลุม 24 ชั่วโมง.
2. ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท PC 12-AC ในสภาวะที่มีน้ำตาลเข้มข้นสูงและต่ำกว่าปกติ.
3. สรุปผลการทดลองและเขียนรายงานฉบับสมบูรณ์.

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เพื่อใช้สนับสนุนการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อระบบประสาทอัตโนมัติ.
2. เพื่อทำการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและมีศักยภาพเชิงพาณิชย์.
3. ลดการใช้สัตว์ทดลองโดยการหาวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับมาทดแทน เพื่อรองรับการไม่ใช้สัตว์ทดลองในอนาคต.
4. ได้วิธีการทดลองใหม่ๆ ที่สามารถให้บริการวิจัยการศึกษาการออกฤทธิ์ของสมุนไพรต่อเซลล์ประสาท.

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุและสารเคมี

1. สารสกัด “ใบหม่อน” ภายใต้ชุดโครงการ วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตสารสกัดปรับมาตรฐานจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติระดับอุตสาหกรรม ของฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ.
2. Pheochromocytoma murine cell line (PC 12 : ATCC CRL-1721) บริษัท ATCC, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
3. *di* -Sodium hydrogen phosphate dihydrate ($Na_2HPO_4.2H_2O$), GR grade, บริษัท MERCK, ประเทศเยอรมนี.
4. Sodium dihydrogen phosphate dehydrate ($NaH_2PO_4.2H_2O$), GR grade, บริษัท MERCK, ประเทศเยอรมนี.
5. L-tyrosine, บริษัท SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, ประเทศเยอรมนี
6. Tyrosinase from mushroom , บริษัท Fluka, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
7. D-glucose, บริษัท Fluka, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
8. 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-Dopa), AR grade, บริษัท SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, ประเทศเยอรมนี.
9. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปราศจากเชื้อ (Steriled PBS), บริษัท GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
10. Minimum essential media (MEM), บริษัท GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
11. Dubelco’s Minimal Essential Medium (DMEM), บริษัท GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
12. Fetal Bovine serum, บริษัท GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
13. Horse serum, บริษัท GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
14. Penicillin/streptomycin, บริษัท GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
15. Foetal Bovine serum, บริษัท GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
16. 0.25% Trypsin-versine (trypsin / EDTA), บริษัท GIBCO, ประเทศแคนาดา.
17. 0.05% Trypsin-versine (trypsin / EDTA), บริษัท GIBCO, ประเทศแคนาดา.
18. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA), บริษัท GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
19. สีย้อมทริปแพนบลู (Tryphan blue 0.4%), บริษัท GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.

20. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), บริษัท GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
21. สารละลายซิงก์แอซีเทต, บริษัท Fluka, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
22. Dimethyl sulfoxide (DMSO), บริษัท Sigma Chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
23. Nerve Growth Factor -7S (NGF-7S), บริษัท Sigma Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
24. Triton X-100, บริษัท Sigma Chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
25. Human Collagen Type I ELISA (Kit) จากบริษัท Cosmo Bio Co.LTD ประเทศญี่ปุ่น.
26. Pepsin (powder) Sigma Chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
27. Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane, บริษัท Fluka Chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
28. สารละลาย Hydrogenperoxide (H_2O_2) บริษัท Sigma Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
29. Tween 80 บริษัท Sigma Chemical Co. Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา.
30. Methanol AR grade, บริษัท Lab Scan ประเทศไทย.
31. Ethanol (95 %) (EtOH), commercial grade, บริษัท องค์การสุรามหาชน จำกัด, ประเทศไทย.

2.2 อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่า (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E, บริษัท Scientific industries, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
2. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 204, บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
3. เครื่องเขย่าคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic bath), บริษัท Astrason ประเทศสหรัฐอเมริกา.
4. ปิเปตต์อัตโนมัติขนาด10, 20, 50, 200, และ 1,000 ไมโครลิตร, บริษัท Gilson, ประเทศฝรั่งเศส.
5. กระดาษกรอง เบอร์ 4, บริษัท Whatman International, ประเทศอังกฤษ.
6. Syringe filter PTFE 0.2 และ 0.45 ไมโครเมตร, บริษัท Vertical Chromatography, ประเทศไทย.
7. Ultrasonic bath, Astrason® ประเทศสหรัฐอเมริกา.

8. Autoclave, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น.
9. Balance AG204, Mettler-Toledo International Inc., ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
10. กระดาษ 75 Blue Wipers บริษัท คิมเบอร์ลี่ย์-คล๊าค ประเทศไทย.
11. Allegra X-I5R Centrifuge, Beckman Coulter, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
12. เครื่องชั่ง Ohaus Europe GmbH, รุ่น E 02140, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์.
13. กระบอกฉีดยาขนาด 1-5 มิลลิลิตร, Nipro(Thailand) Co., Ltd, จังหวัดอยุธยา.
14. Microtube ขนาด1.5 มิลลิลิตร, Sarstedt Co., Ltd, ประเทศเยอรมนี.
15. ตู้ปลอดเชื้อ ระดับ 2 (Laminar Air Flow Class II), Hereus, ประเทศเยอรมนี.
16. เครื่องชั่งความละเอียด ทศนิยม 2 ตำแหน่ง, AND, รุ่น EK120 i ประเทศญี่ปุ่น.
17. Multiskan Go Microplate reader, Thermo Fisher Scientific, ประเทศฟินแลนด์.
18. เครื่อง CO_2 Incubator, Hera Cell 150, Thermo electron corporation, ประเทศเยอรมนี.
19. เครื่อง Centrifuge, Allegra X-15R, Beckman Coulter, ประเทศสหรัฐอเมริกา.
20. กล้อง Invert Microscopic ชนิด Phase contrast, NIKON TS100F, Nikon Corporation, ประเทศญี่ปุ่น.
21. นาฬิกาจับเวลา, บริษัท Canon, ประเทศไทย.
22. Sonicator, Elma S60H, ประเทศเยอรมนี.
23. ตู้อบลมร้อน, Memmert, ULM 400, ประเทศเยอรมนี.

2.3 วิธีการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารสกัด และจากการเหนี่ยวนำด้วยระดับน้ำตาลที่สูงและต่ำกว่าปกติ ในการเพาะเลี้ยงชนิด Pheochromocytoma โดยวิธีการของ Despina 2009

1. การเตรียมเซลล์ Pheochromocytoma murine cell line (PC 12 : ATCC CRL 1721)

1.1 เตรียมเซลล์ PC12 ที่ความเข้มข้น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร บ่มในตู้บ่มเซลล์ 72 ชั่วโมง ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.

1.2 เมื่อครบ 48-72 ชั่วโมง ทำการดูดและเป่าอาหารเลี้ยงเซลล์ภายใน flask ให้เป็นลักษณะ cell suspension.

1.3 จากนั้น นำ cell suspension ที่กระจายตัวหลุดออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยวๆ อย่างสม่ำเสมอ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำการขจัดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง เติม DMEM medium (+ serum) เพื่อเตรียมพร้อมเซลล์ให้กลายเป็น Differentiated cell.

2. การ Differentiated cell โดยใช้ Nerve growth factor (NGF) เพื่อให้ได้เป็น PC12-AC Cell

นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปรับเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยการเพิ่ม 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อใช้กระตุ้นให้เซลล์เกิดการ Differentiation ตลอดการทดสอบ โดยทำการสับเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 -3 วัน.

3. การเตรียมเซลล์เพื่อการทดสอบ

2.1 เตรียมเซลล์ PC12-AC ที่ความเข้มข้น 6.25×10^3 เซลล์/มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร บ่มในตู้บ่มเซลล์ นาน 24 ชั่วโมง ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส.

2.2 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่ได้ จากนั้น เจือจางเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 6.25×10^3 เซลล์/มิลลิลิตร ใน well plate ชนิด 96 หลุม บ่มในตู้บ่มเซลล์ 24 ชั่วโมง ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.

4. การทดสอบ ประยุกต์ใช้วิธีของ Despina *et al*. (2009)

4.1 การเตรียมสารทดสอบ

สารตัวอย่าง “สารสกัดใบหม่อน” นำมาละลายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่อง sonicate หลังจากนั้นนำมา dilute แต่ละความเข้มข้นที่ 5, 10, 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 5, 10, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์.

สารละลาย “glucose” ความเข้มข้นที่ 1.1 และ 150 มิลลิโมลต่อลิตร

4.2 วิธีการทดสอบ

4.2.1 Cytotoxicity การทดสอบฤทธิ์ต้านความเป็นพิษของเซลล์จากการสารสกัดใบหม่อนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Pheochromocytoma โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Freshney, 2005 และ Despina, 2009.

นำ PC12-AC ใน 96 well plate จำนวน 200 ไมโครลิตร มาเติมสารสกัดใบหม่อน ที่ความเข้มข้น (0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มในตู้บ่มเซลล์นาน 96 ชั่วโมง ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ประเมินผลโดยวิธี MTT assay.

4.2.2 Cytoprotective effect on glucose level หรือ neuroprotective effect (Low glucose) ประยุกต์ใช้วิธีการของ Despina H, 2009.

นำ PC12-AC ใน 96 well plate จำนวน 200 ไมโครลิตรมาเติมด้วยสารละลาย ระดับน้ำตาลต่ำกว่าปกติ (Low glucose :glucose toxicity) และสารสกัดใบหม่อน ที่ความเข้มข้น (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มในตู้บ่มเซลล์ ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง วัดผลอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT assay.

4.2.3 Cytoprotective effect on glucose level หรือ neuroprotective effect (High glucose) ประยุกต์ใช้วิธีการของ Despina, 2009.

นำ PC12-AC ใน 96 well plate จำนวน 200 ไมโครลิตร มาเติมด้วยสารละลาย ระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติ (Low glucose :glucose toxicity) และสารสกัดใบหม่อน ที่ความเข้มข้น (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มในตู้บ่มเซลล์ ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง วัดผลอัตราการรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay.

5. การประเมินผลการทดสอบ

5.1 หลังจากปล่อยให้เซลล์สัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมงแล้ว จากนั้น ทำการวัดร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตโดย MTT assay.

5.2 ดูด media เก่าทิ้ง และเติมสารละลาย MTT ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร MTT บ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2 นาน 4 ชั่วโมง.

5.3 เมื่อครบเวลา ดูดสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วย DMSO 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที.

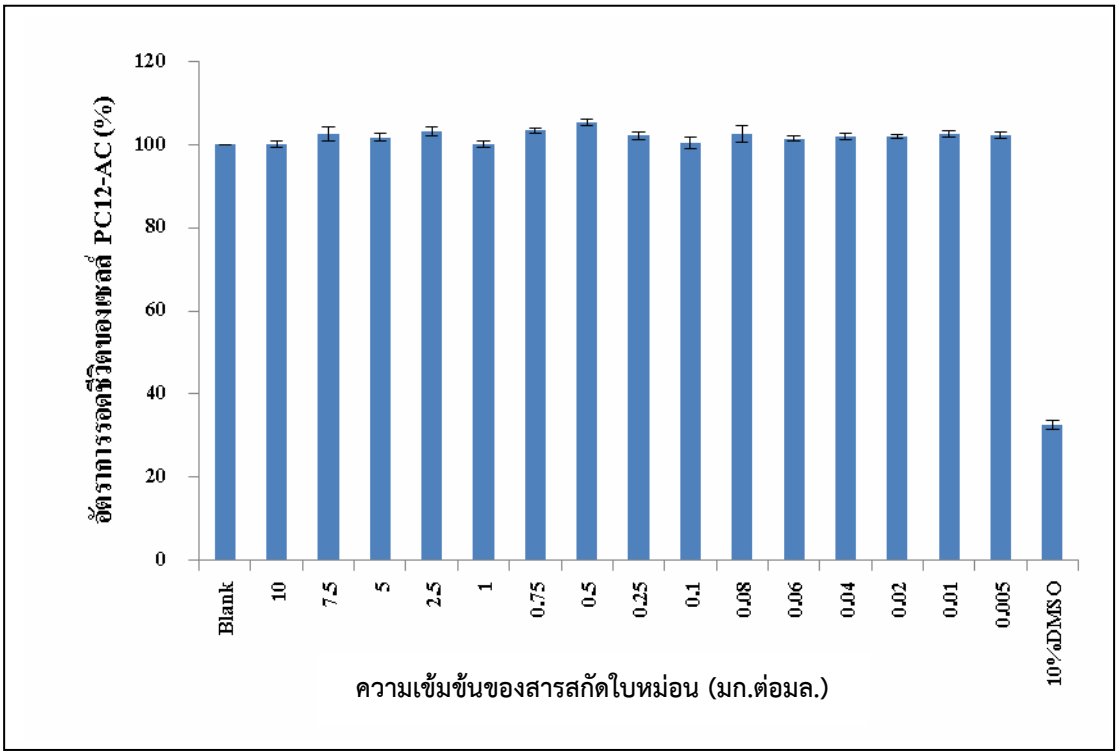
5.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเทียบกับกลุ่มควบคุม.

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Pheochromocytoma จากการเหนี่ยวนำด้วยระดับน้ำตาลที่ต่ำและสูงกว่าปกติ

3.1 Cytotoxicity การทดสอบฤทธิ์ต้านความเป็นพิษของเซลล์จากสารสกัดใบหม่อนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Pheochromocytoma ประยุกต์ใช้วิธีการของ Freshney RI 2005 และ Despina H 2009

ผลการศึกษา พบว่า ร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อได้รับการสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันนาน 96 ชั่วโมง พบว่า ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่สารสกัดใบหม่อนสามารถละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีความเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แต่เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Blank) แล้ว พบว่า ไม่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ มีอัตราร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 99.96±0.79 โดยระยะเวลาดังกล่าวเป็นช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับการทดสอบที่ประยุกต์ตามวิธีการของ Despina 2009 ต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1.



รูปที่ 1. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง.

ตารางที่ 1. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อน (มก.ต่อมล.)	ร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์
Blank (Media + normal glucose)	100.00 ± 0.00
10	99.96 ± 0.79
7.5	102.55 ± 1.64
5	101.75 ± 0.95
2.5	103.17 ± 1.02
1	99.96 ± 0.79
0.75	103.45 ± 0.64
0.5	105.35 ± 0.85
0.25	102.16 ± 0.97
0.1	100.32 ± 1.33
0.08	102.46 ± 1.95
0.06	101.41 ± 0.57
0.04	101.85 ± 0.79
0.02	101.96 ± 0.43
0.01	102.54 ± 0.68
0.005	102.25 ± 0.65
Positive control (10%DMSO)	32.57 ± 0.99

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด PC12-AC เมื่อได้รับสารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณความเข้มข้นสูงสุดที่สารสกัดดังกล่าวสามารถละลายได้นั้น ไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ชนิดนั้นๆ เลย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Blank) สรุปได้ว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้เซลล์ลดลงกึ่งหนึ่งของสารสกัดใบหม่อน (IC_{50}) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.

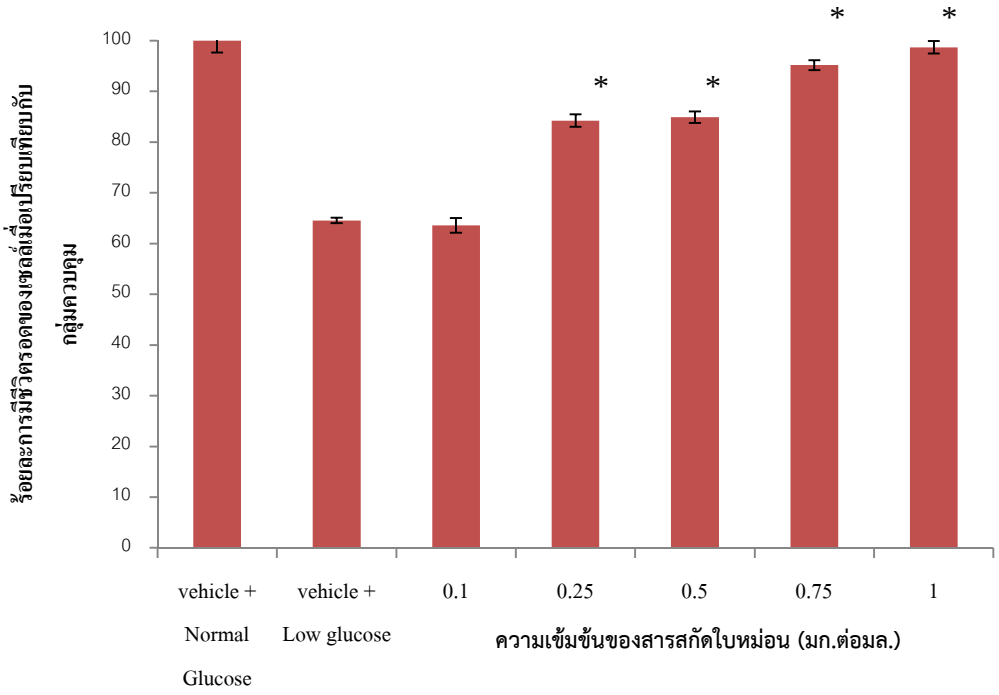
3.2 Cytoprotective effect on glucose level หรือ neuroprotective effect (Low glucose) ประยุกต์ใช้วิธีการของ Despina 2009

จากผลการศึกษา พบว่า สภาวะระดับน้ำตาลที่ต่ำกว่าปกติในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกตินั้นพบว่าก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ PC12-AC เนื่องจากทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 64.54±0.54 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสภาวะอาหารปกติ และเมื่อทำการศึกษาต่อเนื่องกับการสัมผัสสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะน้ำตาลที่ต่ำกว่าปกตินาน 96 ชั่วโมง พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อนที่ 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากกลุ่มควบคุมบวก (Vehicle + Low glucose) แบบ dose response อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนี้ คือ ร้อยละ 84.21 ± 1.23, 84.91 ± 1.15, 95.16 ± 0.99 และ 98.67 ± 1.23 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 2.

ตารางที่ 2. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลต่ำกว่าปกติ (Low glucose : glucose toxicity: 1.1 mmol/L)

ความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อน (มก.ต่อมล.)	ร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์
Blank (Vehicle + normal glucose)	100.00 ± 2.34
Blank (Vehicle + Low glucose)	64.54 ± 0.54
0.1	63.57 ± 1.43
0.25	84.21 ± 1.23*
0.5	84.91 ± 1.15*
0.75	95.16 ± 0.99*
1	98.67 ± 1.23*

หมายเหตุ: *Mean±SE; $p \leq 0.05$ กับกลุ่มควบคุม (Vehicle + Low glucose)
; by ANOVA and post hoc Fisher LSD



หมายเหตุ: *Mean±SE ; $p \leq 0.05$ กับกลุ่มควบคุมบวก (Vehicle + Low glucose)
; by ANOVA and post hoc Fisher LSD

รูปที่ 2. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลต่ำกว่าปกติ (Low glucose :glucose toxicity: 1.1 mmol/L).

จะเห็นได้ว่าเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันโดยใช้สถิติ ONE WAY ANOVA พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ช่วยปกป้องเซลล์ PC12-AC จากสภาวะที่มีระดับน้ำตาลต่ำกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการปกป้องเซลล์ PC12-AC ภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลต่ำกว่าปกติ นอกจากนั้น ประสิทธิภาพของการปกป้องเซลล์ยังแปรผันตรงกับระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อนที่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย (Dose-response).

ดังนั้น แสดงว่าสารสกัดใบหม่อนมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ PC12-AC ภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลต่ำกว่าปกติ ตามความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อนที่เพิ่มขึ้น.

3.3 Cytoprotective effect on glucose level หรือ neuroprotective effect (High glucose) ประยุกต์ใช้วิธีการของ Despina H 2009

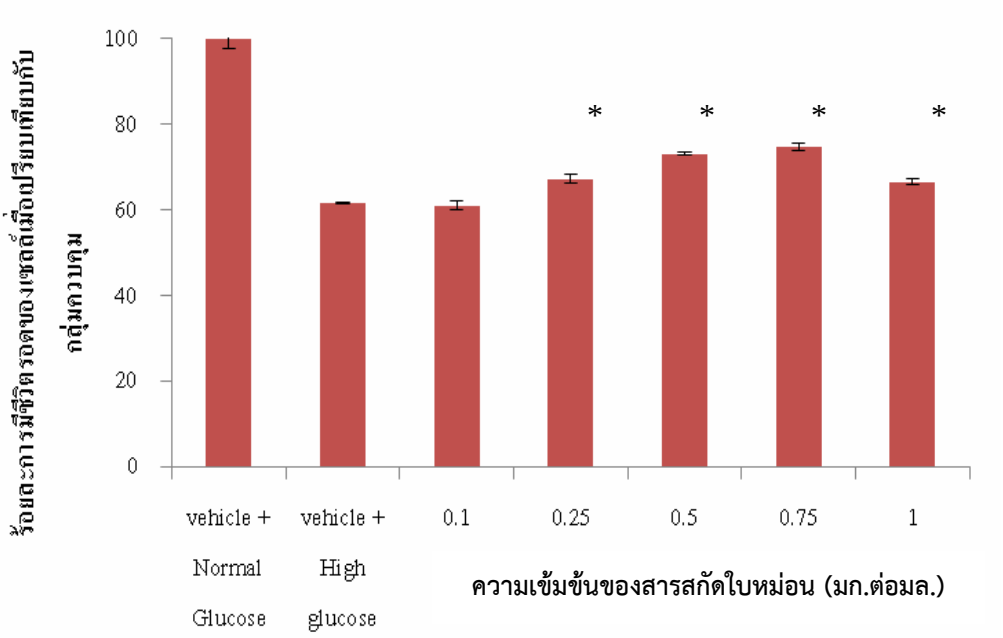
ผลการศึกษา พบว่า ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติ (High glucose :glucose toxicity: 150 mmol/L) ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 3.

ตารางที่ 3. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติ (High glucose :glucose toxicity: 150 mmol/L)

ความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อน (มก.ต่อมล.)	ร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์
Blank (Vehicle + normal glucose)	100.00 ± 2.34
Blank (Vehicle + High glucose)	61.48 ± 0.14
0.1	60.98 ± 0.98
0.25	67.18 ± 0.98*
0.5	73.12 ± 0.23*
0.75	74.86 ± 0.89*
1	66.59 ± 0.54*

หมายเหตุ: *Mean±SE ; $p \leq 0.05$ กับกลุ่มควบคุม (Vehicle + High glucose)
; by ANOVA and post hoc Fisher LSD

จากผลการศึกษา พบว่า สภาวะระดับน้ำตาลที่สูงกว่าปกติในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกตินั้น พบว่าก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ PC12-AC เนื่องจากทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 61.48± 0.14 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสภาวะอาหารปกติ และเมื่อทำการศึกษาต่อเนื่องกับการสัมผัสสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะน้ำตาลที่สูงกว่าปกตินาน 96 ชั่วโมง พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อนที่ 0.25, 0.5 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากกลุ่มควบคุม (Vehicle + High glucose) ดังนี้ คือ ร้อยละ 67.18 ± 0.98, 73.12 ± 0.23 และ 74.86 ± 0.89 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2.



หมายเหตุ: *Mean±SE ; $p \leq 0.05$ กับกลุ่มควบคุมบวก (Vehicle + High glucose)
; by ANOVA and post hoc Fisher LSD

รูปที่ 3. ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง PC12-AC เมื่อสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วงระยะเวลา 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติ (High glucose: glucose toxicity: 150 mmol/L).

จะเห็นได้ว่าเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันโดยใช้สถิติ ONE WAY ANOVA พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ช่วยปกป้องเซลล์ PC12-AC จากสภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้นระหว่างช่วง 0.25, 0.5 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ PC12-AC ภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แบบ dose response.

4. สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Pheochromocytoma (PC12) ที่ได้รับการกระตุ้นหรือ differentiation ด้วย Nerve growth factor ให้กลายเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด PC12-AC ของสารสกัดใบหม่อน ที่ความเข้มข้น (0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 7.5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยวิธี MTT assay พบว่า ร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์ PC12-AC เมื่อได้รับการสัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ช่วงเวลา 96 ชั่วโมง ความเข้มข้นสูงสุดที่สารสกัดใบหม่อนสามารถละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 10 mg/ml อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีความเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แต่เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Blank) แล้วพบว่า ไม่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ มีอัตราร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 99.96 ± 0.79 ดังนั้น อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้เซลล์ลดลงกึ่งหนึ่งของสารสกัดใบหม่อน (IC_{50}) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมมีค่ามากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการทดสอบในภาวะที่ระดับน้ำตาลที่ต่ำกว่าปกติที่สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ปกตินั้น พบว่าก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ PC12-AC โดย พบว่า ที่สภาวะอาหารที่มีระดับน้ำตาลต่ำกว่าปกติ คือ 1.1 มิลลิโมลต่อลิตร ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือเพียง 64.54±0.54 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสภาวะอาหารปกติ และภายใต้สภาวะเดียวกัน ทำการทดสอบโดยให้เซลล์สัมผัสสารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากกลุ่มควบคุม (Vehicle + Low glucose) ดังนี้ คือ ร้อยละ 63.57 ± 1.43, 84.21 ± 1.23, 84.91 ± 1.15, 95.16 ± 0.99 และ 98.67 ± 1.23 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันโดยใช้สถิติ ONE WAY ANOVA พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ช่วยปกป้องเซลล์ PC12-AC จากสภาวะที่มีระดับน้ำตาลต่ำกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดสอบที่ได้แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ PC12-AC ภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลต่ำกว่าปกติ แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อน (Dose-response effect).

จากการศึกษาและทดสอบในภาวะระดับน้ำตาลที่สูงต่ำกว่าปกติจากสภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ปกตินั้น พบว่า ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ PC12-AC โดย พบว่า ที่สภาวะอาหารที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติ ทำให้ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือเพียง 61.48±0.14 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสภาวะอาหารปกติ และเมื่อทำการศึกษาต่อเนื่องกับการสัมผัสสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะน้ำตาลที่สูงกว่าปกติ พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อนที่ 0.25,

0.5 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจากกลุ่มควบคุม (Vehicle + High glucose) ดังนี้ คือ ร้อยละ 67.18 ± 0.98, 73.12 ± 0.23 และ 74.86 ± 0.89 ตามลำดับ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันโดยใช้สถิติ ONE WAY ANOVA พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ช่วยปกป้องเซลล์ PC12-AC จากสภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ PC12-AC ภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติ ดีที่สุด ดังนั้น แสดงว่าสารสกัดใบหม่อนมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ PC12-AC ภายใต้สภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงกว่าปกติเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ช่วงระหว่าง 0.25 ถึง 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.

สรุปผลการทดลอง พบว่า สารสกัดใบหม่อน (ร้อยละ 95 เอทานอล) ที่ขนาดความเข้มข้นระหว่าง 0.5 ถึง 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านอาการเซลล์ประสาทถูกทำลายในโรคเบาหวาน.

5. ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองในครั้งนี้จะดำเนินการทดสอบสารสกัดที่ได้จากโครงการภายใต้ชุดโครงการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตสารสกัดปรับมาตรฐานจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติระดับอุตสาหกรรม จึงมีข้อเสนอแนะ ดังนี้

1. สารสกัดที่ได้จากโครงการมีเพียง 1 สารเท่านั้นที่ถูกนำมาทดสอบ เนื่องจากโรงงานสกัดสารยังอยู่ระหว่างการปรับปรุง.
2. การทดสอบครั้งนี้มีสารตัวอย่างเพียงสารเดียว จึงยังไม่สามารถเปรียบเทียบกับสารที่ไม่มีฤทธิ์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าว ดังนั้น ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมหลังจากโรงงานสกัดสารดำเนินการได้อย่างสมบูรณ์.

ผลการศึกษาเบื้องต้นทางด้านตลาดและผลกระทบของโครงการ

5.1 การนำผลงานวิจัยไปใช้ในทางปฏิบัติ

ผลงานวิจัยมีผู้ใช้ประโยชน์/มีตลาดรองรับที่แน่นอนชัดเจน

ผลจากงานวิจัยที่ได้จัดเป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดก่อนที่จะนำไปศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยากับสัตว์ทดลอง ข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์ สำหรับใช้คัดเลือกสารว่ามีความเป็นพิษหรือมีประสิทธิภาพในการจะนำไปศึกษาต่อในสัตว์ทดลองหรือไม่ เพื่อเป็นการลดการใช้สัตว์ทดลองในเบื้องต้นแล้วยังช่วยประหยัดงบประมาณและเวลาในการทำการวิจัย นอกจากนี้ ยังสามารถนำข้อมูลหรือฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้นำไปพัฒนาต่อยอดหรือศึกษาในเชิงลึก หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไป.

ดังนั้น องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจักเป็นประโยชน์และสร้างความเชื่อมั่นของนักวิจัย, นักทดลอง, ผู้ประกอบการ รวมถึงเกษตรกรที่ต้องการเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรว่าพืชสมุนไพรดังกล่าวมีคุณประโยชน์สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ได้.

ภาคเอกชน/ชุมชน/สังคมสามารถนำผลงานวิจัยไปต่อยอดให้เกิดมูลค่าเพิ่ม/หรือนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง

ภาคเอกชน/สังคม สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้เพื่อไปใช้ต่อยอดในการศึกษาวิจัย โดยใช้เป็นแนวทางในการวิจัย เพื่อเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบ และสารสกัดรวมถึงใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการพัฒนาผลิตภัณฑ์.

นอกจากนั้น ความรู้ที่ได้ยังใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ เพื่อให้ประชาชนหรือสังคมรับรู้ถึงคุณประโยชน์และโทษของพืชสมุนไพรเหล่านั้น และสร้างความเชื่อมั่นให้ภาคอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากพืชสมุนไพร.

มีทรัพยากร/วัตถุดิบที่หาได้ง่ายและเพียงพอ สำหรับให้ภาคเอกชน/ชุมชน/สังคม นำผลงานวิจัยไปใช้ได้ในทางปฏิบัติ

สืบเนื่องจากโครงการนี้เป็นโครงการเพื่อสนับสนุนโครงการอื่นๆ ภายในชุดโครงการ ผลที่ได้คือ การได้องค์ความรู้ ที่นำไปใช้เพื่อสนับสนุนผลผลิตหรือสารสกัดจากโครงการย่อยอื่นๆ ในชุดโครงการว่าผลผลิตที่ได้จากโครงการนั้นๆ มีฤทธิ์ทางชีวภาพและมีคุณประโยชน์อย่างไร, ดังนั้น ข้อมูลจากโครงการนี้สามารถใช้ลดขั้นตอนในการศึกษาหรือสำรวจประสิทธิภาพของสมุนไพรที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบ.

5.2 ผลกระทบที่ได้รับจากการใช้ผลงานวิจัย

มูลค่าทางเศรษฐกิจ (ลดต้นทุนการผลิต, เพิ่มรายได้, ลดการนำเข้า และเพิ่มการส่งออก ฯลฯ)

องค์ความรู้ที่ได้เมื่อนำไปต่อยอดจะทำให้เพิ่มมูลค่าการตลาดของพืชสมุนไพร และสารสกัดจากสมุนไพรภายในประเทศ หากสามารถนำผลที่ได้ไปต่อยอด และศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้ สามารถลดการนำเข้ายาสังเคราะห์จากต่างประเทศ และผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอาจเป็นตัวเลือกสำหรับผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากสมุนไพรที่สามารถส่งออกไปยังต่างประเทศได้ในอนาคต.

คุณค่าเชิงสังคม (คุณค่าชีวิตที่ดีขึ้น, เสริมสร้างสุขภาพอนามัย และกระจายรายได้สู่ชุมชน ฯลฯ)

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการพัฒนาผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพรสามารถนำไปเพิ่มรายได้รวมถึงลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าหรือใช้ยาจากต่างประเทศได้ ทั้งนี้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ใช้วัตถุดิบหลักเป็นพืชสมุนไพร จึงลดผลข้างเคียงหรือการตกค้างของสารภายในร่างกายเมื่อเทียบกับสารสังเคราะห์ ทำให้ผู้บริโภคมีสุขภาพอนามัยที่แข็งแรงจากประโยชน์ของพืชสมุนไพรดังกล่าว, รวมทั้งการส่งเสริมการปลูกพืชดังกล่าวเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบย่อมมีประโยชน์ยิ่งในการเพิ่มรายได้ เมื่อประชาชนในชุมชนมีรายได้มากขึ้น ย่อมส่งผลถึงคุณภาพชีวิตที่เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน.

สามารถสร้างองค์ความรู้ใหม่เพื่อต่อยอดทางเทคโนโลยี

วิธีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อระบบประสาทอัตโนมัติที่มีส่วนในการทำให้เกิดโรค ดังนั้น วิธีการศึกษาที่ใช้ในการศึกษาในโครงการนี้สามารถนำมาใช้ต่อยอดสำหรับงานวิจัยทางด้านการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรหรือพืชตัวอื่นๆ ทั้งนี้ สามารถพัฒนาเป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้นและนำไปอ้างอิงเพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สำหรับการวิจัยด้านอื่นที่ทดแทนการใช้สัตว์ทดลองและเป็นที่ยอมรับ.

5.3 ความคุ้มค่าของโครงการวิจัยในภาพรวม

5.3.1 ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง.

5.3.2 ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดต่อการป้องกันเซลล์ถูกทำลายจากภาวะระดับน้ำตาลสูง.

5.3.3 ได้เรียนรู้วิธีการทดสอบใหม่ๆ ที่เป็นที่ยอมรับจากการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง.

5.3.4 สามารถสร้างรายได้จากการรับบริการวิจัยเพื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการรักษาโรคเบาหวานด้วยวิธีการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง PC 12.

6. เอกสารอ้างอิง

Ali, M.S., Seyed, H.M., Mona, F. and Bagher, L., 2007. Study of High Glucose-Induced Apoptosis in PC12 cells: Role of Bax Protein. *J Pharmacol Sci*., **104**, pp. 258-262.

Briganti, S., *et al*., 2003. Pigment Cell Research, **16**, pp. 101.

Ballantyne B., and Cawley T.J., 1999. Toxicology update. *J. App. Toxicol*., **19**(4), pp. 291-294.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.- Wiss. -Technol.*, **28**, pp. 25-30.

Courtney, N., *et al*., 1991. Dopaminergic regulation of dopamine release from PC12 cells via a pertussis toxin-sensitive G protein. *Neurosci. Lett*., **122**, pp. 261-264.

Despina, H., *et al*., 2009. Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: partII. Can. *J. Physiol. Pharmacol*, **87**, pp. 479-492.

Douglas, A.W., Wanda, R.O., Dennis, A.J. and Madeleine, D., 1989. Synergistic enhancement of type I and III collagen production in cultured fibroblasts by transforming growth factor-β and ascorbate. *Febs Letters*, **250**(2), pp. 541-544.

Donald, S.D., Ye, L. and Ronald, J.B., 1999. Dopamine receptor antagonists modulate glucose uptake in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Neuroscience Letters*, **274**, pp. 151-154.

Dung H., *et al.*, 2007. Depigmenting effect Cinnamomum cassia Presl in B16F10 melanoma cells. *Korean Journal of Chemical Engineering*, **24**(5), pp. 827-830.

Freshney, R.I., 2005. Culture of Animal Cell: A manual of Basic Technique. New York: Wiley-Less, Chapter, **21**, pp. 287-307.

Harold, E.M., *et al*., 2000. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *J. Am. College Nutr*, **19**(3), pp. 312S-319S.

Hui-Min Wang., *et al.*, 2010. -*N*-Formylanonaine from *Michelia alba* as human tyrosinase inhibitor and antioxidant. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **18**, pp. 5,241-5,247.

Inoue K., *et al*., 1992. Dopamine receptor agonists and antagonists enhance ATP-activated currents. *Eur. J. Pharmacol*., **215**, pp. 321-324.

Namita, G.H. and Medha, S.R., 2009. A brief review of in vitro models of diabetic neuropathy. *Int J Diab Dev Ctries*., **29**(4).

Nakazawa, K., *et al*., 1995. Characterization of inhibition by haloperidol and chlorpromazine of a voltage-activated K+ current in rat phaeochromocytoma cells. *Br. J. Pharmacol*., **116**, pp. 2,603-2,610.

Plumb, J.A, Miroy, R. and Kaye, S.B., 1989. Effect of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by novel tetrazolium nased assay. *Cancer Res*., **49**, pp. 4,435-4,440.

Suk, W.K., *et al.*, 2002. Fibroblasts and ascorbate regulate epidermalization in reconstructed human epidermis. *Journal of Dermatological Science*, **30**, pp. 215-223.