**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

**โครงการ**

# การเปลี่ยนแปลงกระบวนการแอกทินโพลิเมอไรเซชั่นในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสชรา

Actin polymerization changes in aged hippocampal neurons

**ผศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์**

**หัวหน้าโครงการผู้รับทุน**

**โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินราย**

**ได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)**

**ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559**

**รหัสโครงการ 222914**

**สัญญาเลขที่ 34/2559**

**รายงานวิจัยฉบับบสมบูรณ์**

**โครงการ**

# การเปลี่ยนแปลงกระบวนการแอกทินโพลิเมอไรเซชั่นในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสชรา

Actin polymerization changes in aged hippocampal neurons

**หัวหน้าโครงการผู้รับทุน**

**ผศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์**

**คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา**

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 34/2559

## Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 34/2559)

# บทคัดย่อ

ผลกระทบของภาวะชราแบบปกติต่อการสร้างความจำถูกศึกษาเป็นอย่างมากในแบบจำลองสัตว์ทดลอง ถึงแม้ว่าแบบจำลองสัตว์ทดลองจะให้ข้อมูลที่ดี แต่การทดลองแบบนี้ก็ยากที่จะตัดปัจจัยแทรกซ้อนอื่นๆภายในร่างกายอันได้แก่ อิทธิพลของฮอร์โมน อาหารที่ได้รับ ตลอดจนกิจวัตรประจำวันต่างๆ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาในหลอดทดลองที่จะสร้างเป็นแบบจำลองภาวะชรา โดยเฉพาะในฮิปโปแคมปัสซึ่งเป็นเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับความจำ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะ ศึกษาผลของความชราต่อการแสดงออกของ synaptic proteinในแบบจำลองภาวะชราในหลอดทดลอง การศึกษาแบบจำลองภาวะชราในหลอดทดลองครั้งนี้ใช้เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมาทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 21 วัน จากนั้นศึกษาการทำงานของเอนไซม์ beta-galactosidase เพื่อบ่งชี้ว่าเซลล์เข้าสู่ภาวะชราด้วยชุดวัดสำเร็จรูป นอกจากนี้ยังศึกษาค่าการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay อีกด้วย การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณ synapse เป็นกลไกหลักที่ใช้ในการบ่งชี้ภาวะความจำ ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงทำการศึกษาการแสดงออกของ synaptic protein ที่สำคัญ ได้แก่ cofilin และ neuroligin ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายที่พบมากบริเวณ synapse ด้วยวิธี western blot โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มีการแสดงออกของ neuroligin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยง 16, 8, และ 2 วัน แสดงให้เห็นว่า ในภาวะชราเป็นสาเหตุของการแสดงออกที่ลดลงของ neuroligin ไม่เกี่ยวกับ cofilin สรุปได้ว่า การทำงานของ synapse ลดลงในภาวะชราเป็นแบบขึ้นกับ neuroligin การค้นพบครั้งนี้อาจจะนำไปสู่กลไกใหม่ของภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ

## Abstract

The impact of normal aging on memory function was highly studied by using an in vivo animal model. Although in vivo study may be highly informative, these may be difficult to exclude internal side effect of body including hormone, food intake, as well as daily routine. However, there is no study in an *in vitro* model of aging especially in hippocampus, neuron-associated memory function. Therefore, the present study aims to investigate the effect of aging on synaptic protein expression *in vitro* model of aging. This aging model used primary hippocampal neuron culture for 21 days. Then, the activity of enzyme beta-galactosidase was determined by ELISA kit. In addition, cell viability of hippocampal neuronal culture was determined by MTT assay. The structural change of synapse is the main mechanism of memory loss. Therefore the present study demonstrated the expression of synaptic proteins such as cofilin and neuroligin, target proteins of synaptic function by using Western bolt. The result showed that the expression of neuroligin significant decreased in 21 days of culture compare to the 8, 5, and 2 days of culture. It indicated that aging as a cause of the decrease in neuroligin expression, but not cofilin. It concluded that synaptic dysfunction in aging is neuroligin-dependent pathway. This finding may be provided a novel mechanism of memory loss in aging.

# สารบัญเรื่อง

หน้า


1. บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน 1

1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 2

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย 4

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 4

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

2. เนื้อเรื่อง

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย 5

2.2 ผลการทดลอง 7

3. อภิปราย/วิจารณ์

3.1 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินงาน 11

3.2 อภิปรายผลการทดลอง 11

4. สรุปและเสนอแนะ 12

5. ผลผลิต 12

บรรณานุกรม 13

ประวัติคณะผู้วิจัย 16

# สารบัญภาพ

**รูปที่ 1** การแสดงออกของ cofilin ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเพาะเลี้ยงที่เวลา 2 8 16 และ 21 DIV 7

**รูปที่ 2** กราฟแสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเพาะเลี้ยงในแบบจำลองภาวะชราในหลอดทดลอง ที่เวลา 2, 8, 16, และ 21 DIV 8

**รูปที่ 3** กราฟแสดงร้อยละของระดับออกของ เอนไซม์ beta-galactosidase ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ที่เวลา 2 8 16 และ 21 วันในหลอดทดลอง 9

**รูปที่ 4** การแสดงออกของโปรตีน Neuroligin ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส ที่เวลา 2 8 16 และ 21 วันในหลอดทดลอง 10

# คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

| | |
|---|---|
| uM | micromolar |
| ml | milliliter |
| DIV | days in vitro |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| ELISA | The enzyme-linked immunosorbent assay |
| NaF | Sodium Fluoride |
| PIP2 | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate |
| PBS | phosphate buffered saline |
| Rock | Rho-associated protein kinase |
| SA-ß-gal | beta-galactosidase |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| StAR | steroidogenic acute regulatory protein |

# 1. บทนำ (Introduction)

## 1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน

การเปลี่ยนแปลงทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และเทคโนโลยี รวมถึงความก้าวหน้าทางด้านการแพทย์ ส่งผลทำให้ประชากรมีอายุยืนยาวขึ้น ซึ่งข้อมูลจากกระทรวงสาธารณสุขเปิดเผยว่าประชากรผู้สูงอายุในประเทศไทยเพิ่มขึ้นปีละ 5 แสนคน และคาดว่าในปี 2568 ประเทศไทยก้าวเข้าสู่การเป็น "สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์" [1] ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งที่พบในกลุ่มผู้สูงอายุ ได้แก่ ภาวะความจำเสื่อม ซึ่งเป็นกลุ่มอาการที่สำคัญ สมองเสื่อม (dementia) ซึ่งเป็นกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติในการทำงานของสมอง แบบค่อยเป็นค่อยไป ส่งผลโดยตรงต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำของผู้สูงอายุ [2] การสูญเสียความจำในระยะแรกเป็นแบบไม่รุนแรง เรียกว่า mild cognitive impairment และเป็นระยะที่สามารถทำให้ความจำกลับมาเป็นปรกติได้ [23] ในทางตรงกันข้ามหากไม่ได้รับการดูแลรักษาที่ถูกต้องก็จะนำไปสู่การเป็นโรคความจำเสื่อมแบบถาวร หรือ โรคอัลไซเมอร์ได้ในที่สุด [23] แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจนของการสูญเสียความจำในผู้สูงอายุ จึงทำให้ยังไม่มีแนวทางการป้องกันและการรักษาที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ดังนั้นหากทราบถึงกลไกการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ก็จะเป็นแนวทางในการป้องกันการสูญเสียความจำแบบถาวรในผู้สูงอายุได้ในที่สุด

เป็นที่ทราบกันดีว่าฮิปโปแคมปัส คือส่วนของสมองที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการสร้างความจำ โดยอาศัยกลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ประสาทบริเวณฮิปโปแคมปัส โดยเฉพาะที่บริเวณเดนไดรติกสไปน์ (dendritic spine) ได้แก่ การเพิ่มขนาด การเพิ่มจำนวน และการเพิ่มความแข็งแรงของ dendritic spine เรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า synaptic plasticity และถือเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำ [3, 6-7, 9, 11, 24] ในอดีตเชื่อว่าการสูญเสียความจำนั้นเป็นผลมาจากการตายของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส [12] แต่ต่อมางานวิจัยจำนวนมากกลับพบว่าการสูญเสียความจำในหนูทดลองที่มีอายุ 25-28 เดือน (จัดอยู่ในระยะชรา) เกิดขึ้นโดยไม่มีการเสื่อมของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส [20-21] ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตายของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมิใช่กลไกสำคัญของภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ ในภาวะชราเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมีการเปลี่ยนแปลงทั้งกระบวนการทางชีวเคมีและรูปร่างของเซลล์ [4, 8, 14, 16, 17] ที่สำคัญ ได้แก่ บริเวณไซแนปส์ [13, 18] Nicholson และคณะ (2005) แสดงให้เห็นว่า dendritic spine มีขนาดลดลงในสัตว์ทดลองที่มีภาวะความจำเสื่อมในระยะชรา [15] นอกจากนี้ยังมีการสูญเสียความแข็งแรงทางโครงสร้างบริเวณ synapse นำไปสู่การสูญเสียกระบวนการ synaptic plasticity ในที่สุด [5]

เนื่องจากแอกทิน (actin) เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักบริเวณ dendritic spine ดังนั้นกระบวนการ actin polymerization จึงน่าจะเป็นกลไกสำคัญของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณ dendritic spine ภายใต้กระบวนการ synaptic plasticity [10, 15-16, 19] การควบคุมการต่อสาย actin อาศัยการทำงานของโปรตีนที่สำคัญในกลุ่มของ actin binding protein ที่สำคัญได้แก่ cofilin ซึ่งมีหน้าหลักคือการต่อสาย actin โดยการคงสภาพของ filament actin และเพิ่ม actin monomer สำหรับการสร้างสาย actin ใหม่ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า cofilin มีบทบาทสำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ actin

dynamics และ actin plasticity มีการศึกษากลไกการควบคุมการทำงานของ cofilin ในเซลล์ T-lymphocyte โดยแสดงให้เห็นว่าการเติมหมู่ฟอสเฟตบนตำแหน่ง serine 3 ทำให้ cofilin อยู่ในระยะ inactive และหากเอาหมู่ฟอสเฟตออกจากตำแหน่งดังกล่าว จะเปลี่ยนไปอยู่ในระยะ active แต่อย่างไรก็ตาม กลไกที่จะควบคุมการเติมหมู่ phosphate ยังไม่สามารถสรุปได้ อีกทั้งยังไม่มีการศึกษากลไกการควบคุม cofilin ในภาวะชราของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการควบคุมการทำงานของโปรตีนทั้งสองนี้อาศัยการกระตุ้นการส่งสัญญาณเซลล์ในเส้นทาง Rho/Rock กล่าวคือ ในภาวะปรกติหากทำการยับยั้ง Rho kinase จะเป็นการยับยั้งกระบวรการ synaptic plasticity จากการศึกษาในสัตว์ทดลองเปิดเผยว่าการยับยั้งการทำงานของ actin binding protein เช่น cofilin มีผลต่อการสร้าง และ การคงสภาพของ dendritic spine ตลอดจนมีผลรบกวนความจำและการเรียนรู้ของสัตว์ทดลองอีกด้วย [22] จึงเป็นไปได้ว่าในผู้สูงอายุที่มีภาวะความจำเสื่อมอาจมีการรบกวนสมดุลของสายแอกทิน นำไปสู่สูญเสียโครงสร้างและหน้าที่ของ synapse นอกจากกลุ่มของ actin งานวิจัยที่ผ่านมา ในปี 2559 ของ Liu A และคณะแสดงให้เห็นว่า Neuroligin เป็น type I transmembrane protein ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการสร้างและการทำงานของ synapse โดยมีการทดลองสนับสนุยว่า overexpression ของ neuroligin เพิ่มจำนวนของ spine และ synapse ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Chih 2004; Boucard 2005) นอกจากนี้หากทำการ knockout neuroligin ทำให้สูญเสีย synaptic transmission โดยไม่มีผลต่อจำนวนของ synapse แสดงให้เห็นว่า neuroligin มีความสำคัญต่อหน้าที่การทำงานของ synapse ซึ่งน่าจะมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อกระบวนการ synaptic plasticity ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ประสาท การเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของโปรตีนโครงสร้างภายในเซลล์ ทั้ง actin และ neuroligin และภายในเซลล์ประสาท ภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่เข้าสู่ภาวะชรา เพื่อเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการป้องกันและรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุต่อไป

**1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา**

การเปลี่ยนแปลงทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และเทคโนโลยี รวมถึงความก้าวหน้าทางด้านการแพทย์ ส่งผลทำให้ประชากรมีอายุยืนยาวขึ้น ซึ่งข้อมูลจากกระทรวงสาธารณสุขเปิดเผยว่าประชากรผู้สูงอายุในประเทศไทยเพิ่มขึ้นปีละ 5 แสนคน และคาดว่าในปี 2568 ประเทศไทยก้าวเข้าสู่การเป็น "สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์" [1] ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งที่พบในกลุ่มผู้สูงอายุ ได้แก่ ภาวะสมองเสื่อม (dementia) ซึ่งเป็นกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติในการทำงานของสมอง แบบค่อยเป็นค่อยไป ส่งผลโดยตรงต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำของผู้สูงอายุ [2] การสูญเสียความจำในระยะแรกเป็นแบบไม่รุนแรง เรียกว่า mild cognitive impairment และเป็นระยะที่สามารถทำให้ความจำกลับมาเป็นปรกติได้ [23] ในทางตรงกันข้ามหากไม่ได้รับการดูแลรักษาที่ถูกต้องก็จะนำไปสู่การเป็นโรคความจำเสื่อมแบบถาวร หรือ โรคอัลไซเมอร์ได้ในที่สุด [24] แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจนของการสูญเสียความจำในผู้สูงอายุ จึงทำให้ยังไม่มีแนวทางการป้องกันและการรักษาที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ดังนั้นหากทราบถึงกลไกการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ก็จะเป็นแนวทางในการป้องกันการสูญเสียความจำแบบถาวรในผู้สูงอายุได้ในที่สุด

เป็นที่ทราบกันดีว่าฮิปโปแคมปัส คือส่วนของสมองที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการสร้างความจำ โดยอาศัยกลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ประสาทบริเวณฮิปโปแคมปัส โดยเฉพาะที่บริเวณเดนไดรติกสไปน์ (dendritic spine) ได้แก่ การเพิ่มขนาด การเพิ่มจำนวน และการเพิ่มความแข็งแรงของ dendritic spine เรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า synaptic plasticity และถือเป็นกลไกหลักของการสร้างความจำ [3, 6-7, 9, 11, 25] ในอดีตเชื่อว่าการสูญเสียความจำนั้นเป็นผลมาจากการตายของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส [12] แต่ต่อมางานวิจัยจำนวนมากกลับพบว่าการสูญเสียความจำในหนูทดลองที่มีอายุ 25-28 เดือน (จัดอยู่ในระยะชรา) เกิดขึ้นโดยไม่มีการเสื่อมของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส [20-21] ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตายของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมิใช่กลไกสำคัญของภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ ในภาวะชราเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสมีการเปลี่ยนแปลงทั้งกระบวนการทางชีวเคมีและรูปร่างของเซลล์ [4, 8, 14, 16, 17] ที่สำคัญ ได้แก่ บริเวณไซแนปส์ [13, 18] Nicholson และคณะ (2005) แสดงให้เห็นว่า dendritic spine มีขนาดลดลงในสัตว์ทดลองที่มีภาวะความจำเสื่อมในระยะชรา [15] นอกจากนี้ยังมีการสูญเสียความแข็งแรงทางโครงสร้างบริเวณ synapse นำไปสู่การสูญเสียกระบวนการ synaptic plasticity ในที่สุด [5]

เนื่องจากแอกทิน (actin) เป็นโปรตีนโครงสร้างหลักของ dendritic spine ดังนั้นกระบวนการ actin polymerization จึงน่าจะเป็นกลไกสำคัญของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณ dendritic spine ภายใต้กระบวนการ synaptic plasticity [10, 15-16, 19] การควบคุมการต่อสาย actin อาศัยการทำงานของโปรตีนที่สำคัญในกลุ่มของ actin binding protein ที่สำคัญได้แก่ cofilin ซึ่งมีหน้าหลักคือการต่อสาย actin โดยการคงสภาพของ filament actin และเพิ่ม actin monomer สำหรับการสร้างสาย actin ใหม่ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า cofilin มีบทบาทสำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ actin dynamics และ actin plasticity การจากการศึกษาในสัตว์ทดลองเปิดเผยว่าการยับยั้งการทำงานของ actin binding protein เช่น cofilin มีผลต่อการสร้าง และ การคงสภาพ ของ dendritic spine ตลอดจนมีผลรบกวนความจำและการเรียนรู้ของสัตว์ทดลองอีกด้วย [22]

มีการศึกษากลไกการควบคุมการทำงานของ cofilin ในเซลล์ T-lymphocyte โดยแสดงให้เห็นว่าการเติมหมู่ฟอสเฟตบนตำแหน่ง serine 3 ทำให้ cofilin อยู่ในระยะ inactive และหากเอาหมู่ฟอสเฟตออกจากตำแหน่งดังกล่าวจะเปลี่ยนไปอยู่ในระยะ active ซึ่งการควบคุมกระบวนการ phosphorylation นี้อาศัยการกระตุ้น phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) [23] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในเซลล์ประสาท พบว่าการทำงานของ cofilin ควบคุมด้วย RhoA pathway กล่าวคือ RhoA ยับยั้ง Rho-associated kinases (ROCK) ทำให้ cofilin อยู่ในระยะ active และมีการต่อสายของ actin ในที่สุด ซึ่งการศึกษาดังกล่าวนี้เป็นภาวะปรกติของเซลล์ประสาทภายใต้กระบวนการ axon outgrowth [26] แต่อย่างไรก็ตามกลไกการควบคุมการทำงานของ cofilin ในภาวะชราของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสนั้นยังไม่มีการรายงาน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการส่งสัญญาณเซลล์ในการควบคุมการทำงานนของ cofilin ภายใต้กระบวนการ actin polymerization ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในระยะชรา เพื่อเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุต่อไป

## 1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

### 1.3.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาการจัดเรียงตัวของ actin บริเวณ dendritic spine ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในภาวะชรา
2. เพื่อศึกษากระบวนการ actin polymerization ภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในภาวะชรา
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของ profilin และ cofilin ภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในภาวะชรา
4. เพื่อศึกษาการกลไกการส่งสัญญาณของเซลล์ (cell signaling) ที่ควบคุมกระบวนการ actin polymerization ของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในภาวะชรา

### 1.3.2 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ dendritic spine การจัดเรียงตัวของโปรตีนโครงสร้างบริเวณ dendritic spine ตลอดจน กลไกการส่งสัญญาณของเซลล์ที่ควบคุมกระบวนการ actin polymerization ภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่เข้าสู่ภาวะชราในหลอดทดลอง เพื่อเป็นพื้นฐานสำคัญในการหาแนวทางป้องกันภาวะความจำเสื่อมรุนแรงต่อไป

## 1.4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

**สมมุติฐาน และกรอบแนวคิด**

เนื่องจากการสร้างความจำอาศัยการจัดเรียงตัวใหม่ของโปรตีนโครงสร้างที่บริเวณ dendritic spine ดังนั้นภาวะการบกพร่องความจำและการเรียนรู้ที่พบในผู้สูงอายุน่าจะเกิดจากการเสียสมดุลของการคงสภาพของโปรตีนโครงสร้างภายในเซลล์นำไปสู่การเกิดโรคความจำเสื่อมแบบถาวรในที่สุด

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เนื่องจากภาวะความจำเสื่อมส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของผู้สูงอายุเป็นอย่างมาก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหากลไกการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทในภาวะความจำเสื่อม เพื่อหาแนวทางการชลอ หรือยับยั้งกระบวนการอันจะก่อให้เกิดภาวะความจำเสื่อมได้ ซึ่งหากเราทราบถึงกลไกการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์โดยละเอียด จะนำไปสู่การพัฒนางานวิจัยต่อยอดได้อีกมาก อาทิเช่น การนำสมุนไพรท้องถิ่น มาใช้รักษาหรือชลอการเปลี่ยนแปลงต่างๆที่เป็นต้นเหตุของภาวะความจำเสื่อมได้อีกด้วย

## 2. เนื้อเรื่อง

**2.1** วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

งานวิจัยทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ทำการทดลอง เก็บข้อมูล วิเคราะห์ผลการทดลอง ณ อาคารวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เลขที่ 169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี

**การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง primary hippocampus neurons**

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ primary hippocampus neurons (Cat number A10841-01) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้จากตัวอ่อนหนูแรทอายุ 18 วัน ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิด neurobasal medium (Gibco) 25 μM ที่ผสมด้วย L-Glutamate และ 2% B27 Supplement (Gibco) ใน poly-L-lysine-coated T-flask (Corning, Corning, NY, USA) ขนาด 25 $cm^2$ ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และความเข้มข้น $CO_2$ ที่ 5% ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2, 8, 16, 21 วันในหลอดทดลอง เพื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงอยู่ในภาวะชรา

**การวัดการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง Primary hippocampus neurons (MTT assay)**

การวัดเปอร์เซ็นการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง primary hippocampus neurons ด้วยวิธี MTT assay โดยมีหลักการ คือสารละลาย MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) จะถูกเปลี่ยนสีจากสีเหลืองไปเป็นผลึกสีน้ำเงิน (formazan crystal) ในเซลล์ที่มีชีวิต โดยอาศัยการทำงานของเอมไซม์ในไมโตคอนเดรีย ในขณะที่เซลล์ตายจะไม่สามารถเปลี่ยนสีสารละลาย MTT ได้ วิธีการทดลอง เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง Primary hippocampus neurons ให้อยู่ในภาวะชราใน 96-well plate ที่เวลาต่างๆ คือ 2, 8, 16, 21 วันในหลอดทดลอง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างเซลล์ด้วย 0.01 M phosphate buffer saline (PBS) ก่อนที่จะบ่มด้วยสารละลาย MTT เป็นเวลา 3 ชั่งโมง จากนั้นทำการละลาย (solubilization) formazan crystal ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 nm

**การวัดภาวะชราของเซลล์จากการทำงานของเอนไซม์ beta-galactosidase**

ภาวะความชราของเซลล์เกิดจากการที่เซลล์ไม่ตอบสนองต่อ mitotic stimuli โดยเซลล์เหล่านี้จะมีขนาดที่ใหญ่ขึ้น มีรูปร่างแบน และมีการสะสมของ lypofuscin เป็น granule อยู่ภายในเซลล์ อีกทั้งมีการการทำงานและการแสดงออกของยีน senescence-associated beta-galactosidase (SA-ß-gal) เปลี่ยนแปลงไปอย่างผิดปรกติ ซึ่งโดยปกติเชื่อกันว่าภาวะที่เซลล์ชราทั้ง แบบ *in vivo* และ *in vitro* จะพบว่ามีความสัมพันธ์กับการทำงานของ SA-ß-gal ดังนั้นหากตรวจพบ SA-ß-gal จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าเซลล์อยู่ในภาวะภาวะชรา ด้วยหลักเกณฑ์นี้ผู้วิจัยจึงทำการวัด SA-ß-gal โดยใช้ cellular senescence assay kit (Chemichon, cat. No. KKA002) กล่าวโดยย่อคือ beta-ß galactosidase จะกระตุ้นกระบวนการ

hydrolysis ของ X-gal ทำให้ได้สีน้ำเงินสะสมอยู่ในเซลล์ชราเท่านั้น เซลล์ที่ไม่อยู่ในภาวะชราจะไม่ปรากฏผลึกสีน้ำเงินดังกล่าว โดยทำการวัดปฏิกิริยาดังกล่าวภายใต้สภาวะกรด (pH 6.0) ซึ่งมีวิธีการอย่างคร่าวๆ ดังนี้คือ หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในภาวะชรา 2, 8, 16, 21 วันในหลอดทดลอง แล้วดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นใส่ fix solution 15 นาทีก่อนบ่มด้วย X-Gal Solution (5-bromo-4-chloro-3-indoly Â-D-galactopyranoside) เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง จากนั้นนับเซลล์ที่ติดสีฟ้าใต้กล้องจุลทรรศน์

**Western blot analysis**

ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้ RIPA buffer (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, EDTA 5 mM, Na2HPO4 30 mM, NaF 50 mM) นำโปรตีนที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 10% SDS-PAGE gel จากนั้นทำการย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane และนำ membrane ไปบ่มใน 5% non-fat milk เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding ก่อนนำไปบ่มด้วย anti-StAR antibody หรือ anti-actin antibody เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำ membrane มาบ่มใน HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA) ทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ chemiluminescent detection kit (Pierce, Rockford, IL, USA) แล้ววัดความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Scion Image

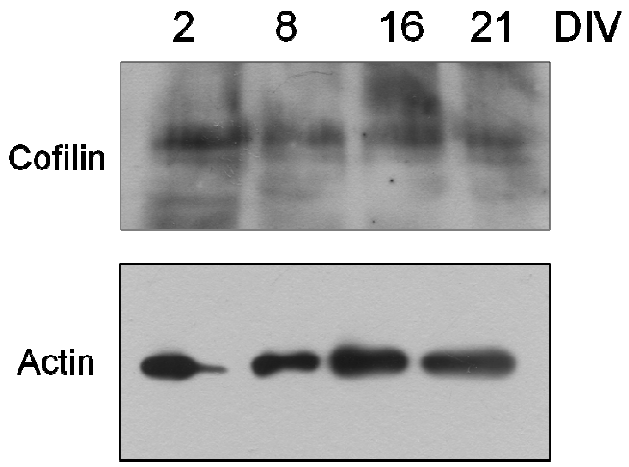
**วิธีการประเมินผลและการสังเคราะห์ข้อมูล**

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means ± SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลสองชุดจะทดสอบโดย unpaired Student’s t-test ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุดจะถูกทดสอบด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey multiple comparison test ความแตกต่างทางด้านสถิติของทุกการทดสอบต้องมีค่า $P \leq 0.05$ ประเมินผลข้อมูลโดย Graph-Pad Prism 5.0

## 2.2 ผลการทดลอง

### 2.2.1 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน cofilin ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเพาะเลี้ยงในแบบจำลองภาวะชราในหลอดทดลอง

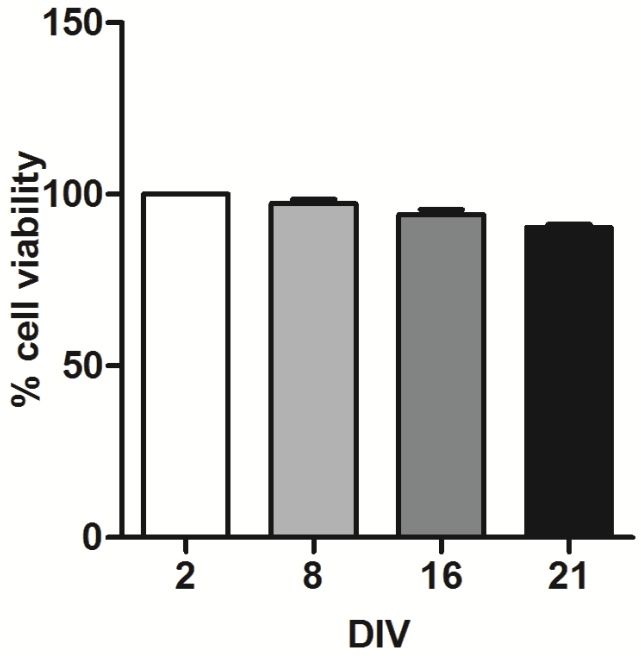
ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน cofilin ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่ถูกเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2, 8, 16, 21 DIV ด้วยวิธี Western Blot โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีน cofilin มีแนวโน้มลดเมื่ออายุเพิ่มขึ้นแต่อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างดังกล่าวนั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเปรียบเทียบกับการแสดงออกของตัวควบคุมภายในคือ actin ซึ่งเท่ากันคงที่ ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 1 บ่งชี้ว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ด้านอื่นๆ อย่างไรก็ตามในแง่ของระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ต่อการแสดงออกของ cofilin อาจจะต้องมีการเพิ่มเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทต่อไป




**รูปที่ 1** การแสดงออกของ cofilin ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเพาะเลี้ยงที่เวลา 2 8 16 และ 21 DIV เปรียบเทียบกับระดับกับการแสดงออกของ actin ซึ่งคงที่ ตลอดการทดลอง โดยทำการศึกษาด้วยวิธี Western Blot

### 2.2.2 ศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเพาะเลี้ยงในแบบจำลองภาวะชราในหลอดทดลอง

ทำการศึกษาค่าการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เวลาต่างกัน 2, 8, 16, และ 21 วัน ด้วยวิธี MTT assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบบจำลองภาวะชราในหลอดทดลองครั้งนี้ไม่มีผลทำให้เซลล์ตาย กล่าวคือไม่มีความแตกต่างของปริมาณผลึกสี formazan crystal ในแต่ละช่วงเวลาจึงส่งผลให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม บ่งชี้ว่าไม่เกิดภาวะที่เป็นพิษต่อเซลล์จนเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ตาย หรือลดปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตลง ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงน่าจะเป็นแบบจำลองที่ดี ที่จะนำไปศึกษาต่อยอดถึงการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ประสาทที่อยู่ในภาวะชราได้ ซึ่งการศึกษาในหลอดทดลองนี้จะมีข้อดีคือเป็นการตัดปัจจัยรบกวนด้านอื่น ทำให้ทราบถึงผลจากการมีอายุที่เพิ่มขึ้นเพียงอย่างเดียว

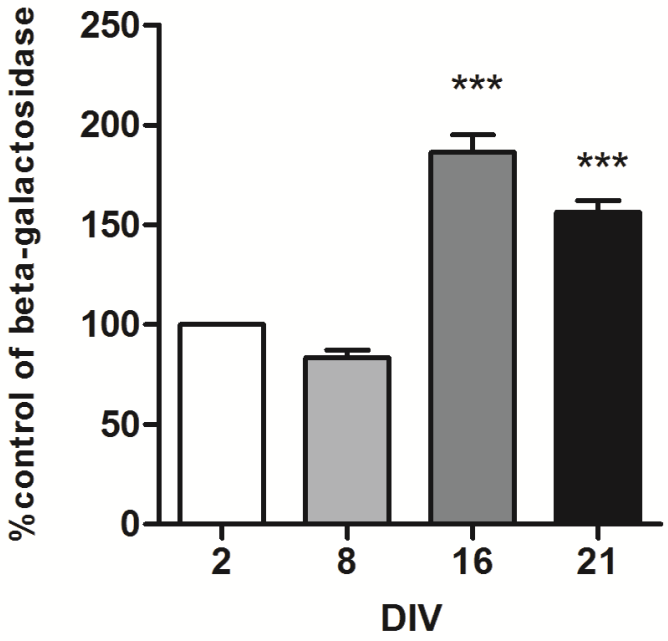



**รูปที่ 2** กราฟแสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเพาะเลี้ยงในแบบจำลองภาวะชราในหลอดทดลอง ที่เวลา 2, 8, 16, และ 21 DIV โดยค่าร้อยละของการมีชีวิตที่ได้คำนวนมาจากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer

(n=5)

**2.2.3 ศึกษาการภาวะชราของเซลล์จากการทำงานของเอนไซม์ beta-galactosidase**

ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ beta-galactosidase ซึ่งจะตรวจพบได้ในเซลล์ที่อยู่ในภาวะชราเท่านั้น โดยผลการทดลองจากการวัด enzyme activity ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธีทำอิไลซ่า แสดงให้เห็นว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่เวลา 16 วันในหลอดทดลองจะมีการเพิ่มระดับของเอนไซม์ beta-galactosidase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม 2 เดือน และ 8 เดือน บ่งชี้ว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 วันขึ้นไปเข้าสู่ภาวะชรา และสามารถใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาภาวะเซลล์ประสาทชราได้

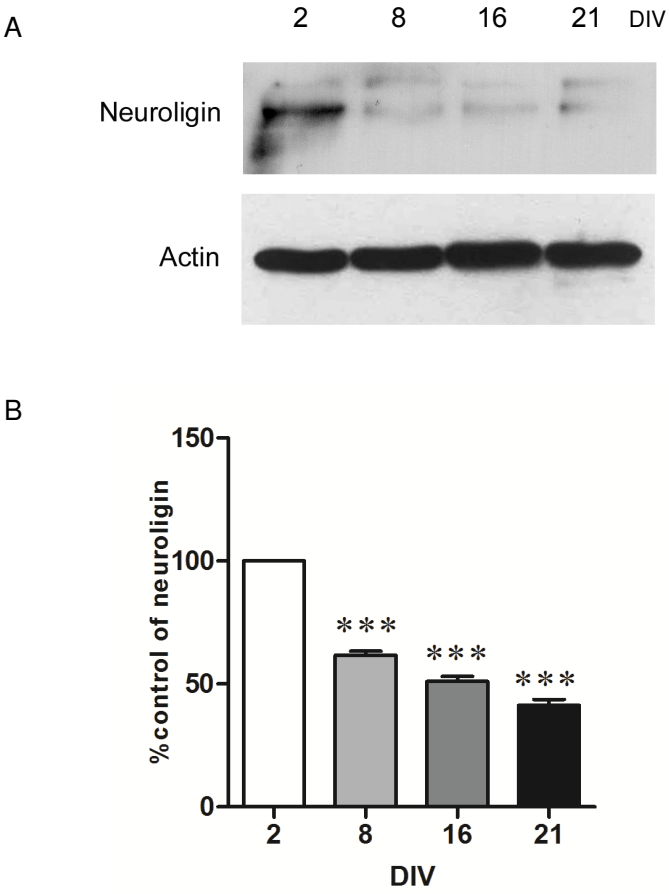



**รูปที่ 3** กราฟแสดงร้อยละของระดับออกของ เอนไซม์ beta-galactosidase ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ที่เวลา 2 8 16 และ 21 วันในหลอดทดลอง ด้วยวิธี ELISA และทำการคำนวนโดยกำหนดให้ระดับของเอนไซม์ที่อายุ 2 เดือน มีค่าเป็น 100

*** P< 0.005 ; n=3

**2.2.4 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Neuroligin ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสเพาะเลี้ยงในแบบจำลองภาวะชราในหลอดทดลอง**

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Neuroligin ในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสที่ถูกเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2, 8, 16, 21 DIV ด้วยวิธี Western Blot (A) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของโปรตีน Neuroligin ลดลงตามเวลาของการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อนำค่าความเข้มของแถบโปรตีนมาคำนวนพบว่า ค่าความเข้า ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 16 และ 21 DIV (B) บ่งชี้ได้ว่าในภาวะที่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงเข้าสู่ภาวะชรา ลดการแสดงออกของโปรตีน Neuroligin ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้บ่งชี้ว่าเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่สำคัญในการทำงานของ synapse จึงอาจจะสรุปได้ว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานานจะมีผลต่อการทำงานขของ synapse และน่าจะมีบทบาทต่อ กระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำ




**รูปที่ 4** การแสดงออกของโปรตีน Neuroligin ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส ที่เวลา 2 8 16 และ 21 วันในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับระดับกับการแสดงออกของ actin ซึ่งคงที่ ตลอดการทดลอง โดยทำการศึกษาด้วยวิธี Western Blot (A) และทำการ plot graph แสดงความเข้มของแถบโปรตีน (B)

*** P< 0.005 ; n=3

**3. อภิปราย/วิจารณ์**

**3.1 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินการ**

เนื่องจากการทดลองที่ 1 แสดงให้เห็นแล้วว่า ภาวะชราในหลอดทดลองไม่มีผลต่อการแสดงออกของ cofilin งานวิจัยนี้จึงตัดเรื่องของการศึกษาการแสดงออกของ active-cofilin และ inactive-cofilin ออกไป และเพิ่มการศึกษาของโปรตีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ synaptic plasticity แทน ได้แก่ Neuroligin ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญมากต่อการทำงานบริเวณ synapse และทำให้สารมารถตอบคำถามของงานวิจัยได้ดีกว่าอีกด้วย

**3.2 อภิปรายผลการทดลอง**

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์สำคัญคือการสร้างแบบจำจองภาวะชราของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในหลอดทดลอง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์โดยตัดอิทธิพลของปัจจัยภายนอกต่างๆ ได้แก่ อิทธิพลของฮอร์โมนเพศ อิทธิพลภาวะแทรกซ้อน และอิทธิพลของพฤติกรรมต่างๆ โดยดูภาวะชราจากการเพราะเลี้ยงเซลลีเป็นเวลานานในหลอดทดลอง (21 วัน) โดยพบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ภาวะชราได้จริงจากการตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ beta-galactosidase ซึ่งจะพบได้เฉพาะในเซลล์ที่ชราเท่านั้น ดังที่ Geng และคณะ แสดงให้เห็นว่าในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูทดลองชราอายุ 24 เดือน มีการแสดงออกของ SA-beta-GAL เพิ่มขึ้นถึง 50.76% เมื่อเทียบกับหนูอายุ 6 เดือน [25] นอกจากนี้ยังทำการศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัส ตรวจพบว่า มีการแสดงออกของ SA-beta-GAL เพิ่มขึ้นถึง 95% เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ในหลอดทดลอง เช่นเดียวกับการทดลองครั้งนี้ที่แสดงให้เห็นว่า มีการเพิ่มขึ้นของ SA-beta-GAL เกือบ 100% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน [25]

นอกจากการทดลองครั้งนี้จะแสดงถึงภาวะชราของเซลล์ประสาทแล้ว ยังแสดงให้เห็นด้วยว่าในภาวะชราเซลล์ยังคงมีค่าการมีชีวิตรอดไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการเปลี่ยงแปลงต่างๆภายในเซลล์จึงน่าจะเป็นผลของภาวะชราเพียงอย่างเดียวโดยไม่เกี่ยวข้องกับการเป็นพิษต่อเซลล์จากผลกระทบด้านอื่น โดยในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2 วัน และทำการเพาะเลี้ยงในปริมาณไม่มากเกินไป ตามวิธีของ Geng และคณะ ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง และไม่ทำให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงตาย [25]

เพื่อเป็นการทดสอบสมมุติฐานของงานวิจัยเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงไปของโปรตีน cofilin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าหลักคือการต่อสาย actin โดยการคงสภาพของ filament actin และเพิ่ม actin monomer สำหรับการสร้างสาย actin ใหม่ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า cofilin มีบทบาทสำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ actin dynamics และ actin plasticity แต่จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า การจากการศึกษาในสัตว์ทดลองเปิดเผยว่าการยับยั้งการทำงานของ actin binding protein เช่น cofilin มีผลต่อการสร้าง และ การคงสภาพ ของ dendritic spine ตลอดจนมีผลรบกวนความจำและการเรียนรู้ของสัตว์ทดลองอีกด้วย [22] แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองครั้งนี้ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ cofilin ทั้งหมด (total cofilin) เพียงแต่มีแนวโน้มของการลดลงซึ่งหากทำการศึกษาถึงระดับยีนส์อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงก็เป็นได้ ดังนั้นในส่วนของโปรตีนตัวนี้น่าจะมีการศึกษาต่อยอด ให้ลึกลงไปถึงระดับยีนต่อไป แต่เมื่อ การแสดงออกของ cofilin ไม่เปลี่ยนผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาโปรตีนเป้าหมายตัวอื่นร่วมด้วย คือ neuroligin ซึ่งเป็น type I transmembrane protein มีความสำคัญมากต่อการสร้างและการทำงานของ synapse โดยมีการทดลองสนับสนุยว่า overexpression ของ neuroligin เพิ่มจำนวน

ของ spine และ synapse ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม [26] นอกจากนี้หากทำการ knockout neuroligin ทำให้สูญเสีย synaptic transmission โดยไม่มีผลต่อจำนวนของ synapse แสดงให้เห็นว่า neuroligin มีความสำคัญต่อหน้าที่การทำงานของ synapse ซึ่งน่าจะมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อกระบวนการ synaptic plasticity [27] และจากผลการทดลอง พบว่า neuroligin มีการแสดงออกลดลงเมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น สรุปได้ว่า neuroligin ลดลงเมื่อเซลล์เข้าสูภาวะชรา นำไปสู่ความสัมพันธ์ที่ว่า การทำงานของ synapse ลดลงเมื่อเซลล์ประสาทเข้าสู่ภาวะชรา

**4. สรุปและเสนอแนะ**

งานวิจัยนี้สามารสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสในหลอดทดลองเป็นเวลานาน ทำให้เซลล์ประสาทเข้าสู่ภาวะชราได้โดยการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ SA-beta-GAL โดยไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ คือ เซลล์ยังคงมีค่าการมีชีวิตทีปรกติจากการวัดการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase enzymes ด้วยวิธี MTT assay นอกจากนี้ยังพบโปรตีนเป้าหมายตัวใหม่ที่น่าจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงของ synapse ในภาวะชราของเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส คือ neuroligin ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนกว่า cofilin อย่างไรก็ตาม ยังคงต้องการการศึกษาต่อยอดถึงการเปลี่ยนแปลงระดับยีน ตลอดจน function ของ neuroligin ที่เปลี่ยนแปลงไปในภาวะชราต่อไป

**5. ผลผลิต**

โดยส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยในโครงการวิจัยนี้กำลังดำเนินการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร วิทยาศาสตร์บูรพา ในชื่อเรื่อง Synaptic changes *in vitro* model of hippocampal neuronal aging.

**บรรณานุกรม**


1. สถาบันเวชศาสตร์ผู้สูงอายุ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2555)
2. สุทธิชัย จิตะพันธ์กุล. (2546). คลินิกเวชปฏิบัติปริทัศน์: ปัญหาการดูแลผู้ป่วยสูงอายุที่มีสมองเสื่อม. วารสารคลินิก. 19 (6). กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณะสุข. (2546). แนวปฏิบัติบริการสุขภาพด้านการดูแลผู้สูงอายุ: การดูแลรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะสมองเสื่อม.
3. Alvarez V. A., Sabatini B. L. (2007). Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. Annu. Rev. Neurosci. 30, 79–97.
4. Arendt T. (2009) Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. ;118(1):167-79.
5. Burke S.N. and Barnes C.A. (2006) Neural plasticity in the ageing brain. Nat Rev Neurosci.7, 30-40.
6. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cell. Neurosci Lett 2010; 470: 49–54.
7. Chamniansawat S, Chongthammakun S. A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. Exp Mol Med. 2012; 44: 403-411.
8. Dong W, Cheng S, Huang F, Fan W, Chen Y, Shi H, He H Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging. Neurotox Res. 2012; 22(3): 231-248.
9. Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. J Neurosci 2000; 20: 3993–4001.
10. Honkura N., Matsuzaki M., Noguchi J., Ellis-Davies G. C., Kasai H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. Neuron 57, 719–729.
11. Lamprecht R, LeDoux J. Structural plasticity and memory. Nat Rev Neurosci 2004; 5(1): 45–54.
12. Kandel ER, Schwartz JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. Science1982; 218: 433–443.
13. Kasai H., Fukuda M., Watanabe S., Hayashi-Takagi A., Noguchi J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. Trends Neurosci. 33, 121–129.
14. Kim MJ, Oh SJ, Park SH, Kang HJ, Won MH, Kang TC, Park JB, Kim JI, Kim J, Lee JY. Neuronal loss in primary long-term cortical culture involves neurodegeneration-like cell

death via calpain and p35 processing, but not developmental apoptosis or aging. Exp Mol Med. 2007; 39(1): 14-26.

15. Korobova F, Svitkina T. (2010). Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. Mol Biol Cell. 21, 165-176.
16. Nicholson D.A., Yoshida R., Berry R.W., Gallagher M., and Geinisman Y. (2004) Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments. J Neurosci. 24, 7648-7653.
17. Nunomura A, Moreira PI, Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Smith MA, Perry G. Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders. Med Sci Monit. 2011; 17(4): BR91-96.
18. Penzes P., Cahill M. E., Jones K. A., Vanleeuwen J. E., Woolfrey K. M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. Nat. Neurosci. 14, 285–293.
19. Pollard T. D., Cooper J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. Science 326, 1208–1212.
20. Rapp P.R., Deroche P.S., Mao Y., and Burwell R.D. (2002) Neuron number in the parahippocampal region is preserved in aged rats with spatial learning deficits. Cereb Cortex. 12, 1171-1199.
21. Rasmussen T., SchliemannT. Sorensen J.C. Zimmer J. and West M.J. (1996) Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. Neurobiol. Aging 17, 143–147.
22. Rust M. B., Gurniak C. B., Renner M., Vara H., Morando L., Gorlich A., et al. (2010). Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. EMBO J. 29, 1889–1902.
23. Seshadri M, Mazi-Kotwal N, Aguis M. (2013) Reversible mild cognitive impairment--a case report. Psychiatr Danub. ;25 Suppl 2:S358-61.
24. Steward O, Worley P. Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? Neurobiol Learn Mem 2002; **78**(3): 508–527.
25. Geng YQ, Guan JT, Xu XH, Fu YC Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 11;396(4): 866-869.
26. Chih B, Afridi SK, Clark L, Scheiffele P. Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. Hum Mol Genet. 2004; 13(14): 1471-1477.

27. Chih B, Engelman H, Scheiffele P. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. Science. 2005; 307(5713): 1324-1328.

## ประวัติคณะผู้วิจัย


1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวศิริพร จำเนียรสวัสดิ์
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Siriporn Chamniansawat
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3240100446071
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่ 169 ถ. ลงหาด บางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131
   โทรศัพท์: 038-103175, โทรสาร: 038-393497
   E-mail: siripornc@buu.ac.th


5. ประวัติการศึกษา
   5.1. ปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยบูรพา ปีที่สำเร็จ 2547
   5.2. ปริญญาโท สาขากายวิภาคศาสตร์ (นานาชาติ) มหาวิทยาลัยมหิดล ปีที่สำเร็จ 2549
   5.3. ปริญญาเอก สาขากายวิภาคศาสตร์และชีววิทยาโครงสร้าง (นานาชาติ) มหาวิทยาลัยมหิดล ปีที่สำเร็จ 2552

   สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ประสาทวิทยาศาสตร์
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
   6.1. หัวหน้าโครงการวิจัย :
      6.1.1.บทบาทของการสังเคราะห์เอสโตรเจนภายในเซลล์ประสาทในภาวะที่มีการให้สาร inflammatory cytokines แก่เซลล์เพาะเลี้ยง H19-7 hippocampal neuron
      ทุน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ปีงบประมาน 2554

      6.1.2. ผลของการอักเสบจากการกระตุ้น microglia ต่อการสังเคราะห์และการออกฤทธิ์ของ local hippocampal estrogen ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการ synaptic plasticity ในเซลล์ประสาท hippocampus
      ทุนพัฒนาศักยภาพศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (สกว.- สกอ.) ปี 2554-2555
7. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

   7.1. Chamniansawat S, Chongthammakun S. A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. Exp Mol Med. 2012;44(6):403-411. ทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 2554 และ ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย 2554-2555

   7.2. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Modultion of microglia in response to prolonged exposure to high glucocorticoid level, implication from an in vitro model of chronic depression. Journal of Neurochemistry 2010; Suppl 1: 19. ทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (ให้แก่ รศ.ดร.สุขุมาล จงธรรมคุณ)

   7.3. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2010; 470: 49–54. ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

7.4. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Estrogen stimulates activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) via MAPK- and PI-3K dependent pathways in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2009; 452: 130–135. ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

7.5. Chamniansawat S and Chongthammakun S. Prolonged and high level of cortisol exposure activates microglial HAPI-cells. Proceedings of Anatomy Association of Thailand 2010; 33: 131–132. ทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (ให้แก่ รศ.ดร.สุขุมาล จงธรรมคุณ)

7.6. Chamniansawat S and Chongthammakun S. Non-genomic effect of estrogen via ERβ and MAPK on activity-regulated cytoskeleton associated protein expression in SH-SY5Y cells. Proceedings of Anatomy Association of Thailand 2009; 32: 29–30. ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

7.7. Chamniansawat S and Chongthammakun S. The effects of genistein on okadaic acid-induced hyperphosphorylated tau protein in SH-SY5Y cells in vitro. Proceedings of 13$^{th}$ TNS conference 2007; 13: 45. ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

7.8. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genistein attenuates hyperphosphorelation of tau protein induced by diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, in SH-SY5Y cells *in vitro*. *J Neurochem* 2008 (Suppl.1); 106: 28. ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา