



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การทดสอบฤทธิ์ของกล้วยในการฟื้นฟูภาวะความจำ
บกพร่องและฤทธิ์ด้านความกังวลในหนูแรท

โดย ดร. พรนรินทร์ เทพวราพฤกษ์ และคณะ

ตุลาคม 2553

สัญญาเลขที่ RDG 5220046

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การทดสอบฤทธิ์ของกล้วยในการฟื้นฟูภาวะความจำ บกพร่องและฤทธิ์ด้านความกังวลในหนูแรท

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1. ดร. พรนรินทร์ เทพาราชพฤกษ์ | ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ |
| 2. ผศ.ดร. นิวัติ เทพาราชพฤกษ์ | ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ |
| 3. นางสาวพรรณ เอกอุฬารพันธ์ | ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก |

ชุดโครงการ “Thai fruits-functional fruits Phase II”

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
Executive Summary	4
บทคัดย่อ	5
Abstract	7
เนื้อหางานวิจัย	
ทบทวนวรรณกรรม	9
วิธีดำเนินการวิจัย	22
ผลการวิจัย	36
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	87
บรรณานุกรม	91
เอกสารรับรองโครงการวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจริยภาพรรณ	97
การใช้สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยนเรศวร	
โปสเตอร์ที่นำเสนอในงานประชุม THAIFEX, World of Food Asia	98

Executive summary

เป็นที่ทราบกันดีว่ากลัยมีคุณประโยชน์อย่างมาก แต่เนื่องจากที่ผ่านมา ยังไม่มีงานวิจัยใดที่ระบุว่าการบริโภคกลัยส่งผลอย่างไรต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ของกลัยในการฟื้นฟูความจำบกพร่องในหนูทดลองที่ความจำเสื่อม รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโน และซีโรโทนินในสมอง ซึ่งในการศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการป้องกันกลัยขนาดต่างๆทุกวันเป็นระยะเวลารวม 90 วัน และหนูทดลองได้ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องด้วย amyloid β peptides ทำการทดสอบผลของกลัยต่อพฤติกรรม การเคลื่อนไหว ต่อการต้านความวิตกกังวล ต่อการฟื้นฟูความจำบกพร่อง จากผลการทดลองพบว่าการบริโภคกลัยส่งผลให้มีพฤติกรรมเคลื่อนไหวลดลง และหนูยังแสดงพฤติกรรมกลัวที่โล่งและกลัวความสูงเหมือนหนูปกติตามธรรมชาติทั่วไป แต่ที่สำคัญสามารถฟื้นฟูความจำบกพร่องได้ โดยที่หนูความจำบกพร่องที่ได้รับกลัยขนาดสูงมีการจดจำเกี่ยวกับวัตถุสิ่งของและมีความจำเกี่ยวกับสถานที่ ดีกว่าหนูกลุ่มความจำบกพร่องที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จึงเป็นไปได้ว่าการบริโภคกลัยขนาดที่สูง มีผลต่อการฟื้นฟูภาวะความจำบกพร่องจากการเหนี่ยวนำด้วย amyloid β peptides ได้ โดยอาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโน ได้แก่ แอสปาเตต และกลูตาเมต ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส เนื่องจากผลการวิเคราะห์ระดับของสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนที่พบว่า หนูควบคุมความจำบกพร่องมีค่าเฉลี่ยของระดับของแอสปาเตต และกลูตาเมต ในฮิปโปแคมปัสต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมปกติ ส่วนหนูความจำบกพร่องที่ได้รับกลัยขนาดต่างๆ มีระดับของแอสปาเตต และกลูตาเมต ที่มากขึ้นตามปริมาณของกลัยที่หนูแต่ละกลุ่มได้รับ แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับเซโรนิน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา อย่างมีนัยสำคัญในหนูแต่ละกลุ่ม นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ระดับสารสื่อประสาทชนิด นอร์อิพิเนฟริน อิพิเนฟริน โดปามีน และซีโรโทนิน ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ของหนูกลุ่มต่างๆ เหล่านี้พบว่า ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มหนูความจำบกพร่องและความจำบกพร่องที่ได้รับกลัยในขนาดต่าง นอกจากนี้ยังอาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ช่วยปกป้องและฟื้นฟูความจำเกิดจากผลของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่มากในกลัยน้ำว่า หรืออาจเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายสารสื่อประสาทชนิด acetylcholine ในระบบประสาทโคลิเนอร์จิก ซึ่งต้องทำการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

บทคัดย่อ

กล้วยน้ำว้าหรือ *Musa sapientum*, Linn เป็นผลไม้ที่มีพบมากแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ส่วนผลประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต แครโทีน โดปามีน อีพินเฟฟิน นอร์อีพินเฟฟิน ซีโรโทนิน วิตามิน และเกลือแร่ต่างๆ เนื่องจากส่วนประกอบของกล้วยบางตัวทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท และยังไม่มีการวิจัยศึกษาผลของกล้วยต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางโดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาผลของการบริโภคกล้วยเป็นระยะเวลานาน (3 เดือน) ต่อการฟื้นฟูความจำบกพร่องจากการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องด้วยการฉีดอะไมลอยด์เบต้าเปปไทด์ ($A\beta_{25-35}$) และทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาทชนิด กรดอะมิโนและแคทีโคลามีนที่ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและเปลือกสมองซีรีรัม

ในการทดลองนี้หนูทดลองคือ Sprague-Dawley เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ ได้ถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (control sham) ที่ถูกฉีดน้ำเกลือที่โพรงสมองและป้อนน้ำกลั่น กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่ม control $A\beta$ ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องโดยการฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ peptides ที่โพรงสมอง และได้รับการป้อนน้ำกลั่น กลุ่มที่ 3-6 เป็นกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องโดยการฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ peptides ที่โพรงสมอง และได้รับกล้วยขนาดต่างๆ อีก 4 ขนาด คือ 0.5, 5, 10 และ 40 ก./กก. น้ำหนักตัว ตามลำดับ จากผลการศึกษา พบว่าการบริโภคกล้วยในขนาดสูงส่งผลให้มีพฤติกรรมเคลื่อนไหวลดลง และหนูทุกตัวยังคงแสดงพฤติกรรมกังวลเมื่อทดสอบด้วยวิธี Elevated Plus Maze

หนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง มีพฤติกรรมที่แสดงความบกพร่องในการจดจำเกี่ยวกับวัตถุสิ่งของโดยใช้ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุเก่ามากกว่าวัตถุใหม่อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Novel Object Recognition และยังแสดงถึงความจำเกี่ยวกับสถานที่ที่บกพร่องโดยใช้ระยะเวลาในการหาแท่นได้นานกว่าหนูในกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบด้วยวิธี Morris Water Maze หนูความจำบกพร่องที่ได้รับกล้วยในขนาดสูง 10 และ 40 ก./กก. น้ำหนักตัว มีการจดจำเกี่ยวกับวัตถุสิ่งของและมีความจำเกี่ยวกับสถานที่ ดีกว่าหนูกลุ่มควบคุมความจำบกพร่องที่ได้รับตัวทำละลาย

ผลการวิเคราะห์ระดับของสารสื่อประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส พบว่าหนูกลุ่มควบคุมความจำบกพร่อง มีค่าเฉลี่ยของระดับของแอสปาเตต กลูตาเมต ต่ำกว่าในหนูกลุ่มควบคุมปกติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสารทั้งสองนี้มีแนวโน้มที่จะมีค่าสูงขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับกล้วยขนาดสูง ในการทดลองนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนตัวอื่นๆ (เช่น เซโรนิน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา) หรือสารสื่อประสาทชนิดแคทีโคลามีน ในหนูแต่ละกลุ่ม

จากผลการทดลองนี้ สรุปได้ว่าการฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าไปที่โพรงสมองสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความบกพร่องในการจดจำ และความจำเกี่ยวกับสถานที่ รวมทั้งการลดระดับของสารสื่อประสาทชนิดแอสปาเตตและกลูตาเมต การได้รับกล้วยที่ขนาดสูงเป็นเวลานาน 3 เดือน สามารถช่วยฟื้นฟูภาวะความบกพร่องที่เหนี่ยวนำด้วย $A\beta_{25-35}$ peptides ได้ ซึ่งการฟื้นฟูความบกพร่องนี้อาจเกิดจากการเพิ่มระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนคือแอสปาเตตและกลูตาเมตในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

คำสำคัญ: กล้วยน้ำว้า, ความจำบกพร่อง, ฮิปโปแคมปัส, สารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโน

Abstract

'Nam-wa' banana or *Musa sapientum*, Linn (BN) is mostly found in the Southeast Asia. The fruit part of BN contains carbohydrate, carotene, dopamine, epinephrine, norepinephrine, serotonin, vitamins and minerals. Since, some biochemical constituents of BN are the neurotransmitters and so far, no study has been conducted to investigate the effects of BN on function of the nervous system, especially on learning and memory. Therefore, this study aimed to investigate effects of a long-term BN oral administration on the improvement of cognitive function in amnesic rats induced by amyloid β_{25-35} ($A\beta$) peptides injection. Changes in the levels of amino acid and catecholaminergic neurotransmitters in the hippocampus and the cerebral cortex were investigated.

The animals used in this study were male 8-week old Sprague-Dawley rats. The rats were divided into 6 groups as Group 1: control sham group which received an intracerebroventricular (i.c.v.) injection of normal saline (NSS) and oral administration of distilled water, Group 2: control $A\beta$ group which received an i.c.v. injection of $A\beta_{25-35}$ peptides and oral administration of distilled water and Groups 3-6: $A\beta$ +BN 0.5, $A\beta$ +BN5, $A\beta$ +BN10, $A\beta$ +BN40-treated groups which received an i.c.v. injection of $A\beta_{25-35}$ peptides and oral administration of BN at the doses of 0.5, 5, 10 and 40 g/kg b.w., respectively.

A high BN administration induced hypolocomotion. In addition, all rats still showed anxiety as tested by Elevated Plus maze. The control amnesia group showed impairment in recognition ability as they significantly spent longer time to investigate familiar object more than novel object as tested by Novel Object Recognition. They also showed spatial impairment as their escape latencies were significantly higher than other groups of rats when tested by Morris Water Maze. Among the BN-treated groups, only $A\beta$ +BN10 and $A\beta$ +BN40 groups showed better recognition ability and spatial memory when compared to the control $A\beta$ that received vehicle.

For the analyses of neurotransmitters in the hippocampus, we found that there were significant decreases in levels of aspartate and glutamate in the control $A\beta$ group. However, these amino acids trended to be increased in the amnesia rats that received high BN. In this study, we did not find any significant change in the level of other amino acid

neurotransmitters (i.e., serine, glutamine, glycine, and GABA) and catecholamine neurotransmitters among group of animals.

In conclusion, the injection of $A\beta_{25-35}$ peptides into the ventricles induced impairment in recognition ability and spatial memory as well as a reduction in the levels of aspartate and glutamate in the hippocampus. A 3-months-period of high dose of banana consumption could help to restore the memory deficits caused by $A\beta_{25-35}$ peptides. This cognitive improvement may probably produce by enhancing levels of some excitatory amino acid neurotransmitters such as aspartate and glutamate in the hippocampus.

Key Words: banana, amnesia, hippocampus, amino acid neurotransmitters

บททวนวรรณกรรม

กล้วยน้ำว้า

กล้วยน้ำว้า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Musa sapientum* Linn. มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นว่า กล้วยน้ำว้าเหลือง กล้วยใต้ หรือ กล้วยอ่อน เป็นกล้วยพันธุ์ลูกผสมระหว่างกล้วยป่ากับกล้วยตานี กล้วยจัดเป็นผลไม้ที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภคทุกเพศทุกวัย ในวัยทารก กล้วยเป็นอาหารกึ่งแข็งชนิดแรกที่สามารถรับประทานได้สำหรับเด็ก เนื่องจากมีคาร์โบไฮเดรต วิตามินบี 6 (B6, B12) และซีลีเนียมแร่ต่าง ๆ เบต้าแคโรทีน โนอาซีน และใยอาหารในปริมาณที่สูง นอกจากนี้โปรตีนที่อยู่ในกล้วยน้ำว้า ที่พบมีกรดอะมิโน อาร์จินิน และฮีสติดีน ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของทารก (Subagio et al., 1996; Borges et al., 2003; Arvanitoyannis and Mavromatis, 2009) แต่มีแคลอรีต่ำ (Horigome et al., 1992) กล้วยยังเป็นผลไม้ที่ทั้งเด็กและผู้ใหญ่ชอบรับประทาน บางครั้งเราทานกล้วยแทนอาหารบางมื้อหรือทานเป็นอาหารว่าง ซึ่งมีรายงานวิจัยระบุว่า การรับประทานกล้วยน้ำว้าสามารถช่วยป้องกันภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ หรือ hypoglycemia (Jain, 1969; Pari and Maheswari, 1999; Dhanabal et al., 2005) และมีสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ช่วยลดอาการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (Krishnan and Vijayalakshmi, 2005; Perez-Perez et al., 2006; Vijayakumar et al., 2008) และจากรายงานของ Yin และคณะในปี 2008 พบว่าในอาสาสมัครที่มีสุขภาพสมบูรณ์ การบริโภคน้ำกล้วยปั่นเพียง 1 มื้อ (กล้วย 400 กรัมปั่นในน้ำ 300 มิลลิลิตร) สามารถลดภาวะ oxidative stress ในเลือดและเพิ่มความต้านทานในการเกิด oxidative modification ของไขมันชนิด low density lipoprotein หรือ LDL ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระในกล้วย (Yin et al., 2008)

มีผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสาร Science ที่เกี่ยวกับผลการวิเคราะห์ทางชีวเคมีของกล้วยโดย Waalkes และคณะ เมื่อปี 1958 พบว่า กล้วยมีซีโรโทนิน (serotonin) และนอร์อะดรีนาลีน (noradrenalin) ในปริมาณค่อนข้างมากคือ 28 และ 1.9 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ (Waalkes et al., 1958) นอกจากนี้กล้วยยังมีปริมาณโดปามีน (dopamine) ที่สูงมาก (Riggin et al., 1976; Kanazawa and Sakakibara, 2000) หนูกุ่มที่ได้รับการป้อนกล้วยสุกเมื่อตรวจปัสสาวะ จะมีการเพิ่มขึ้นของสาร metabolites ของโดปามีนอย่างมีนัยสำคัญ อาทิเช่น vanilmandelic acid (VMA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) และสาร metabolites ของซีโรโทนินคือ 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) เป็นต้น (Marshall, 1959; Vettorazzi, 1974; Odink et al., 1988) ซึ่งโดปามีนเป็นสารสื่อประสาทที่มีบทบาทสำคัญในพฤติกรรมเคลื่อนไหวก้าว (locomotor activity) พฤติกรรมสำรวจ (exploration) แรงจูงใจ (motivation) พฤติกรรมการกิน (feeding behavior) และพฤติกรรมทางเพศ (sexual behavior) ส่วนซีโรโทนินก็มีความสำคัญด้านอารมณ์ (mood) การนอนหลับ (sleep) และ ความอยากอาหาร (appetite) นอกจากนี้ การศึกษาของ

Kanazawa and Sakakibara (2000) ยังรายงานว่า โดปามีนที่ได้จากกล้วยทั้งส่วนเปลือก (peel) และ ส่วนเนื้อ (pulp) มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสาร butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), flavanoids, glutathione และ catechin เมื่อทดสอบด้วยวิธี oxygen uptake of linoleic acid ในระบบ emulsion และมีฤทธิ์ในการ scavenging ของ diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical นอกจากนี้ มีรายงานวิจัยระบุว่า *Musa sapientum* Linn. มีสารทริปโตเฟน (tryptophan) ซึ่งร่างกายสามารถแปลงเป็นสารสื่อประสาทชื่อซีโรโทนิน ที่กระตุ้นให้ ร่างกายรู้สึกผ่อนคลาย อารมณ์สดใสและมีความสุขมากยิ่งขึ้น (Herraiz and Galisteo, 2002) และมี สารที่มีฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดสารสื่อประสาทชนิด acetylcholine ในระบบประสาทโคลิเนอร์จิก (Ingkaninan et al., 2003; Mukherjee et al., 2007) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่า สารสำคัญในกล้วยดังกล่าวข้างต้นอาจมีส่วนช่วยบำรุงสมองในส่วนเกี่ยวข้องกับ การเรียนรู้และความจำ



รูปที่ 1 ต้นกล้วยน้ำว้าและเครือกล้วยในขณะยังดิบ (ซ้าย) และ ลักษณะของกล้วยน้ำว้าเมื่อสุกเต็มที่ (ขวา)

ที่มาของภาพ ซ้าย <http://prathom.swu.ac.th/panmai/pic/7-10110-002-008.JPG>

ขวา http://www.thaicooperative.com/images/Fruit_39.JPG

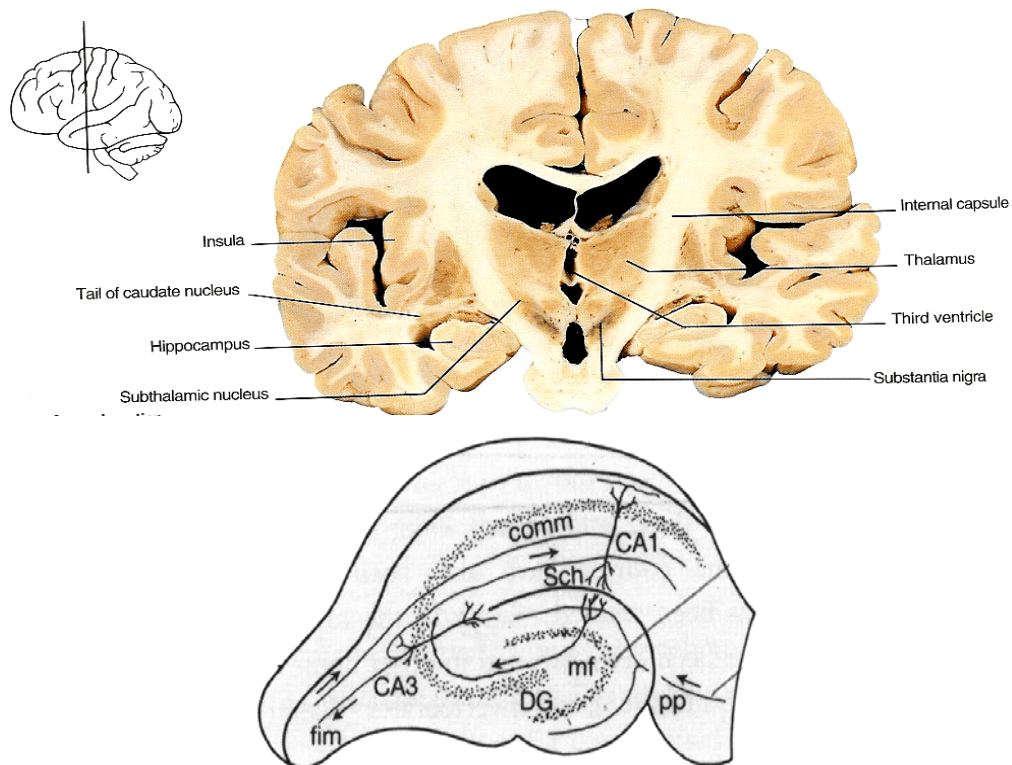
ฮิปโปแคมปัส (hippocampus)

สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรท (รูปที่ 2ก) มีลักษณะคล้ายเม็ดถั่วดำ วางเป็นคู่ที่กลีบสมองส่วน parietal lobe และอยู่จากเปลือกสมอง (cerebral cortex) ของสมองทั้ง 2 ซีก ภายในประกอบด้วยวงจรประสาทที่สำคัญ 2 ส่วน คือ 1) ส่วน Ammon's horn ที่มีเซลล์พิวามิด (pyramidal cells) ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่เป็น cornu Ammonis (CA) ได้แก่ CA1, CA2 และ CA3 (รูปที่ 2 บน) และ 2) ส่วนของ dentate gyrus (DG) ซึ่งประกอบด้วย granule cell เรียงตัวดังรูปที่ 2 (ล่าง)

วงจรประสาท (neuronal circuit) ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสมี 3 วงจรหลักที่มีการเชื่อมต่อกันเป็นทางเดินประสาทจึงเรียกลักษณะดังกล่าวนี้ว่า “trisynaptic circuit” ดังแสดงในรูปที่ 2 (ล่าง)

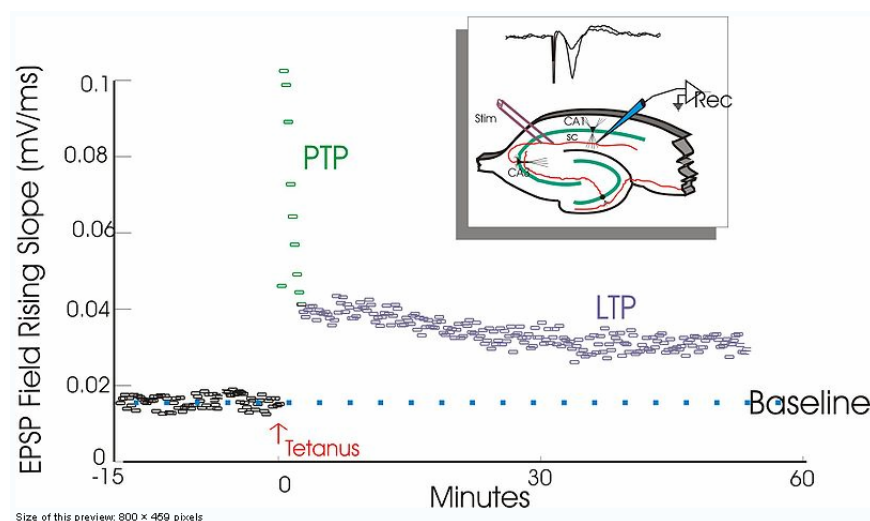
โดยที่สมองส่วน entorhinal cortex ทำหน้าที่เป็นทางเข้าหลักของข้อมูลที่ส่งมาจากสมองส่วนอื่นๆ มายังฮิปโปแคมปัส ผ่านทาง perforant pathway (pp) ต่อไปยังเซลล์ประสาทที่อยู่ในบริเวณ dentate gyrus ข้อมูลจากบริเวณนี้จะถูกส่งต่อผ่านทาง mossy fiber (mf) ไปยังเซลล์ประสาทที่อยู่ในบริเวณ CA3 และส่งต่อข้อมูลผ่านทาง Schaffer collateral pathway (Sch) ไปยังเซลล์ประสาทที่อยู่ในบริเวณ CA1 เซลล์ประสาทหลักที่พบอยู่ในบริเวณ CA1, CA2 และ CA3 คือเซลล์พिरามิด (pyramidal cells) ส่วนบริเวณ dentate gyrus พบมี granule cells และ basket cell of Cajal เป็นต้น กลุ่มเซลล์ประสาทภายในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสมีการเชื่อมต่อเข้ากับกลุ่มของเซลล์ประสาทชนิดต่างๆ อาทิ เช่น กลุ่มเซลล์ประสาทชนิด cholinergic, noradrenergic, dopaminergic และ serotonergic เป็นต้น กลุ่มเซลล์ต่างๆ เหล่านี้มีบทบาทที่สำคัญต่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ในการควบคุมและปรับระดับการทำงานที่ในการประมวลผล

เป็นที่ทราบกันดีว่าฮิปโปแคมปัส เป็นส่วนของสมองที่มีความสำคัญต่อการเรียนรู้และความจำของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สำหรับการอธิบายถึงกลไก/กระบวนการสร้างความจำนั้นอาศัยข้อมูลจากการศึกษาสรีรวิทยาทางไฟฟ้าจากแผ่นผ่านสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ Bliss และ Lomo ในปี ค.ศ. 1973 ที่พบว่าเมื่อกระตุ้นแผ่นผ่านสมองด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความถี่สูงๆ ในระยะเวลาสั้นๆ ที่บริเวณใยประสาท สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ประสาทตัวรับเกิดการตอบสนองด้วยการสร้างศักย์ไฟฟ้า หรือ excitatory postsynaptic potential (EPSP) มีขนาดของแอมพลิจูดเพิ่มมากขึ้นและคงระดับอยู่ได้อย่างยาวนาน ที่เรียกว่า “long-term potentiation (LTP)” (ดังรูปที่ 3) ผลของ LTP ทำให้เซลล์ประสาทตัวรับเกิดการเปลี่ยนแปลง (plasticity) โดยพบว่ามีการงอก (protruding) และขยายขนาดของ dendritic spine ที่อยู่ตรงบริเวณ dendrite ของเซลล์ประสาท พिरามิดในบริเวณ CA1 และ CA3 การส่งสัญญาณในวงจรนี้ใช้กลูตาเมตเป็นสารสื่อประสาท ซึ่งสามารถจับกับตัวรับชนิด N-methyl-D-aspartate (NMDA) ที่บริเวณ post-synaptic neuron ของเซลล์ประสาท ดังนั้นอาจพูดได้ว่า LTP ที่เกิดขึ้นภายในวงจรประสาทของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส เกี่ยวข้องกับระดับกลูตาเมตที่เพิ่มสูงขึ้นและเกิดการกระตุ้น NMDA receptor ซึ่งส่งผลทำให้สมองมีระดับการเรียนรู้และความจำเพิ่มขึ้น (Bianchi et al., 2003 ; Collingridge and Lester, 1989; Harris et al., 1987; McEntee and Crook, 1993)



รูปที่ 2 ภาพบนแสดงตำแหน่งของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของมนุษย์

ภาพล่างแสดงลักษณะโครงสร้างทางเดินประสาทที่มีลักษณะคล้ายวงจรขนาดเล็กของแอกซอน (axon) ใช้ในการส่งผ่านสัญญาณประสาท (คำย่อ: CA = cornu ammonis, pp = perforant pathway, mf = mossy fibers, Sch = Schaffer collateral pathway, DG = dentate gyrus, comm = commissural pathway, fim = fimbria) (ที่มา: library.thinkquest.org และ <http://graulab.tamu.edu>)



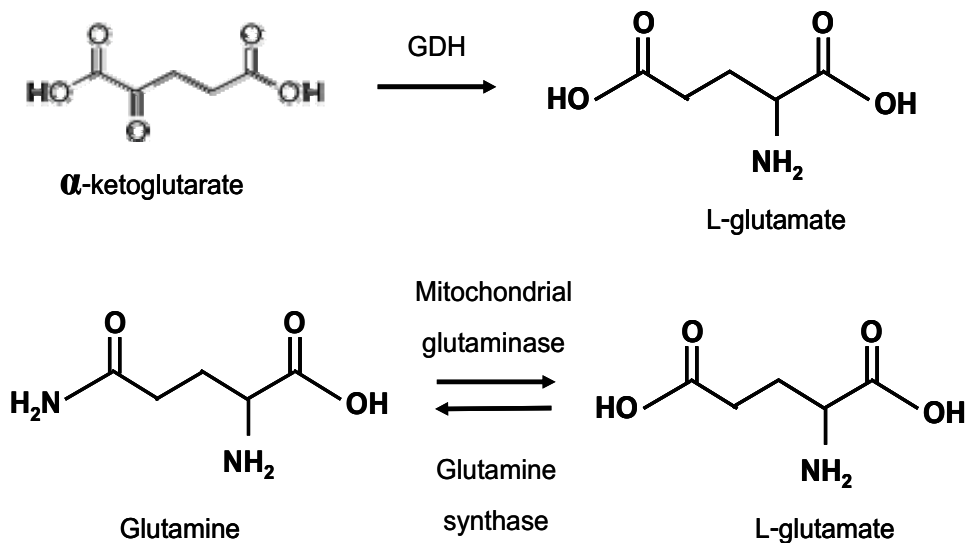
รูปที่ 3 แสดงลักษณะของการเกิด long-term potentiation (LTP) ที่บริเวณ CA1

(ที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/Long-term_potentiation)

กลูตาเมต

กลูตาเมต (Glutamate, Glu) กลูตาเมตจัดเป็นสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้น (excitatory amino acid, EAA) พบในปริมาณมากที่ระบบประสาทส่วนกลางของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยประมาณ 50% มาจากระบบเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ประสาท ประมาณ 20 - 30% สร้างจากเซลล์ประสาท glutamatergic และประมาณ 15% ของทั้งหมดสร้างจากเซลล์ค้ำจุน

กลูตาเมตถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก α -ketoglutarate (α -KG) ซึ่งเป็นสาร intermediate ที่ได้จากเมตาบอลิซึมของกลูโคส โดยมีเอนไซม์ glutamate dehydrogenase (GDH) เร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน α -KG ให้กลายเป็นกลูตาเมต และยังพบว่ากลูตามีนเป็นสารตั้งต้นของกลูตาเมตได้เช่นกัน โดยมีเอนไซม์ mitochondrial glutaminase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนกลูตามีนให้กลายเป็นกลูตาเมต ดังรูปที่ 3 นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของ Hertz และ Zeilke ในปี ค.ศ. 2004 พบว่าเซลล์ค้ำจุนสามารถสังเคราะห์และหลั่งกลูตาเมตได้เช่นเดียวกับเซลล์ประสาท โดยอาศัยกลไก Ca^{2+} -dependent vesicular release โดยใช้กลูตามีนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์



รูปที่ 3 กระบวนการชีวสังเคราะห์ของกลูตาเมต (GDH = glutamate dehydrogenase)

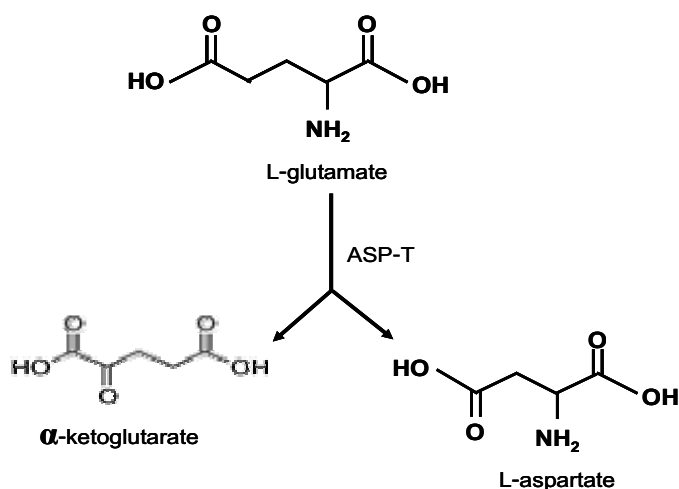
การเปลี่ยนแปลงระดับสารสื่อประสาทกลูตาเมตในสมอง เป็นตัวบ่งบอกถึงพยาธิสภาพบางอย่างที่มีผลกระทบต่อการเรียนรู้และความจำโดยตรง อาทิเช่น ในภาวะการชัก (seizures) จะมีระดับกลูตาเมตในสมองเพิ่มสูงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับระดับปกติ และในทางตรงกันข้าม เมื่อเกิดภาวะสมองเสื่อม (dementia) ส่งผลให้ระดับกลูตาเมตในสมองลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับระดับปกติ ดังนั้นปริมาณสารสื่อประสาทกลูตาเมต และกรดอะมิโนในสมองอาจใช้เป็นตัวชี้ที่ใช้

ประกอบกับผลทางด้านพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ ในการบ่งบอกหน้าที่การทำงานของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส นอกจากมีกลูตาเมตเป็นสารสื่อประสาทตัวหลักแล้ว ยังมีสารสื่อประสาทในกลุ่มของกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ได้แก่ แอสปาร์เตต กาบบา ไกลซีน และเซอรีน เป็นต้น สารสื่อประสาทเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของวงจรประสาทภายในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

แอสปาร์เตต

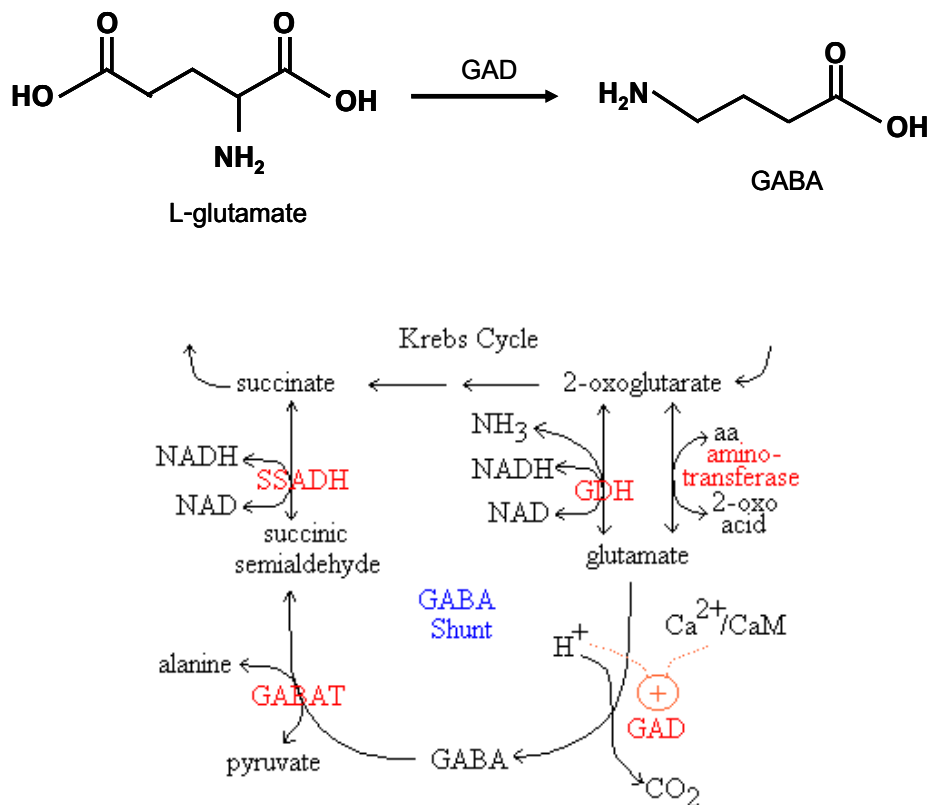
แอสปาร์เตต (aspartate, Asp) เป็นสารสื่อประสาทในกลุ่มอะมิโนชนิดหนึ่ง อยู่ในรูปของ L-aspartate แอสปาร์เตตออกฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางได้เช่นเดียวกับกลูตาเมต กระบวนการชีวสังเคราะห์ของแอสปาร์เตตเกิดขึ้นใน TCA cycle ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเมตาบอลิซึมของกลูโคส โดยเมื่อกลูตาเมตเปลี่ยนกลับไปเป็น α -KG โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ASP transminase (ASP-T) ซึ่งจากปฏิกิริยานี้ทำให้ได้ทั้ง α -KG และแอสปาร์เตต (รูปที่ 4) โดยที่แอสปาร์เตตออกฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทผ่านทาง glutamate receptor ทั้งชนิด ionotropic และ metabotropic receptor มีการศึกษาพบว่าแอสปาร์เตตเลือกจับกับ NMDA receptor ได้ดีกว่า AMPA และ Kainate receptor และมีรายงานว่าที่บริเวณ pre-synaptic terminal ของเซลล์ประสาทขาเข้าชนิดกระตุ้น ที่มายังบริเวณ CA1 ของฮิปโปแคมปัส พบมีการหลั่งแอสปาร์เตตและกลูตาเมตออกมาพร้อมกันได้ ดังนั้นทั้งแอสปาร์เตตและกลูตาเมต จึงเป็นสารสื่อประสาทที่ออกฤทธิ์ร่วมกันในการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง (co-transmitter) โดยเฉพาะส่วนฮิปโปแคมปัส



รูปที่ 4 แสดงกระบวนการชีวสังเคราะห์ของแอสปาร์เตต (L-aspartate)

กาบา

กาบา (gamma aminobutyric acid, GABA) จัดเป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง (inhibitory neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง ทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลภายในสมองเมื่อได้รับการกระตุ้น ช่วยให้สมองผ่อนคลาย ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสพบ GABAergic interneuron อยู่ประมาณร้อยละ 10 ของจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดในฮิปโปแคมปัส ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์กาบา โดยใช้กลูตาเมตเป็นสารตั้งต้นและมีเอนไซม์ glutamic acid decarboxylase (GAD) ในการเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูตาเมตให้กลายเป็นกาบา ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างและกระบวนการชีวสังเคราะห์ของกาบา

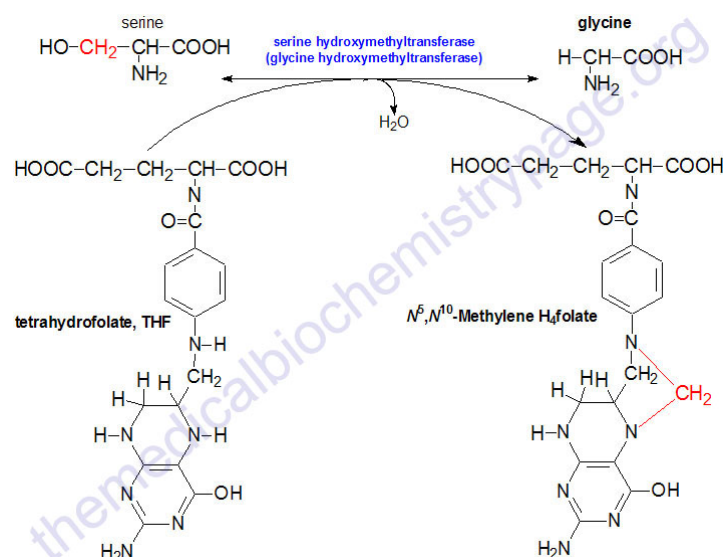
ที่มารูปภาพ: <http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort640c/aminotr/am00009.htm>

เมื่อมีการหลั่งกาบาออกสู่บริเวณซินแนปส์แล้ว กาบาก็จะเข้าไปจับกับ GABA receptor ได้แก่ GABA_A และ GABA_B receptor โดยที่ GABA_A receptor เป็น ion channel receptor ส่งผลต่อการเกิด fast synaptic inhibition ด้วยการยอมให้คลอไรด์ไอออน (Cl⁻) ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ส่วน GABA_B receptor ออกฤทธิ์ผ่านทางระบบ second messenger ในการควบคุมการเปิด-ปิดของ voltage-gated channel ของทั้งไปแตสเซียมและแคลเซียม ส่วนหนึ่งของกาบาที่หลั่งออกมาจะถูก re-uptake กลับเข้าสู่เซลล์บริเวณ pre-synaptic terminal และ glia cell process โดยอาศัยการทำงานของ GABA transporter (GAT) ได้แก่ GAT-1 และ GAT-3 ซึ่งเป็นการหมุนเวียนนำกลับมาใช้ใหม่

ในทางคลินิกมีการนำตัวยาที่ออกฤทธิ์ต่อ GABA receptor ซึ่งส่งผลต่อการยับยั้งระบบประสาทส่วนกลางมาใช้ในการรักษาภาวะความผิดปกติของระบบประสาท เช่น benzodiazepines ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยการเสริมฤทธิ์ของกาบา ผ่านทาง GABA_A receptor ส่งผลต่อการยับยั้งระบบประสาทส่วนกลาง ในทางคลินิกใช้เป็นยานอนหลับ ยาคลายเครียด ยาคลายกล้ามเนื้อ และยาด้านลมชัก เป็นต้น

ไกลซีน

ไกลซีน (glycine, Gly) จัดเป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง (inhibitory neurotransmitter) ในระบบประสาทอีกชนิดหนึ่ง พบในปริมาณมากบริเวณไขสันหลัง และก้านสมอง สร้างจากกรดอะมิโนซีโอเซอรีน เมื่อไกลซีนหลั่งออกสู่บริเวณซินแนปส์แล้ว จะเข้าไปจับกับ glycine receptor (GlyR) ซึ่งเป็น chloride-gated channels ส่งผลให้ระบบประสาทส่วนกลางถูกยับยั้ง ส่วนที่เหลือจะถูกเก็บกลับ โดยอาศัยการทำงานของ glycine transporters (GlyTs) จากการศึกษาพบว่าไกลซีนสามารถเสริมฤทธิ์ของสารสื่อประสาทกลูตาเมตในการกระตุ้น NMDA receptor ที่อยู่ในบริเวณ CA1 ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสได้ โดยเข้าจับที่บริเวณ glycine site ส่งผลให้ LTP มีขนาดศักยภาพเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าไกลซีนทำหน้าที่รักษาสมดุลระหว่างการกระตุ้นและการยับยั้งจากผลของสารสื่อประสาทภายในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส



รูปที่ 6 แสดงกระบวนการชีวสังเคราะห์ของไกลซีน (Glycine)

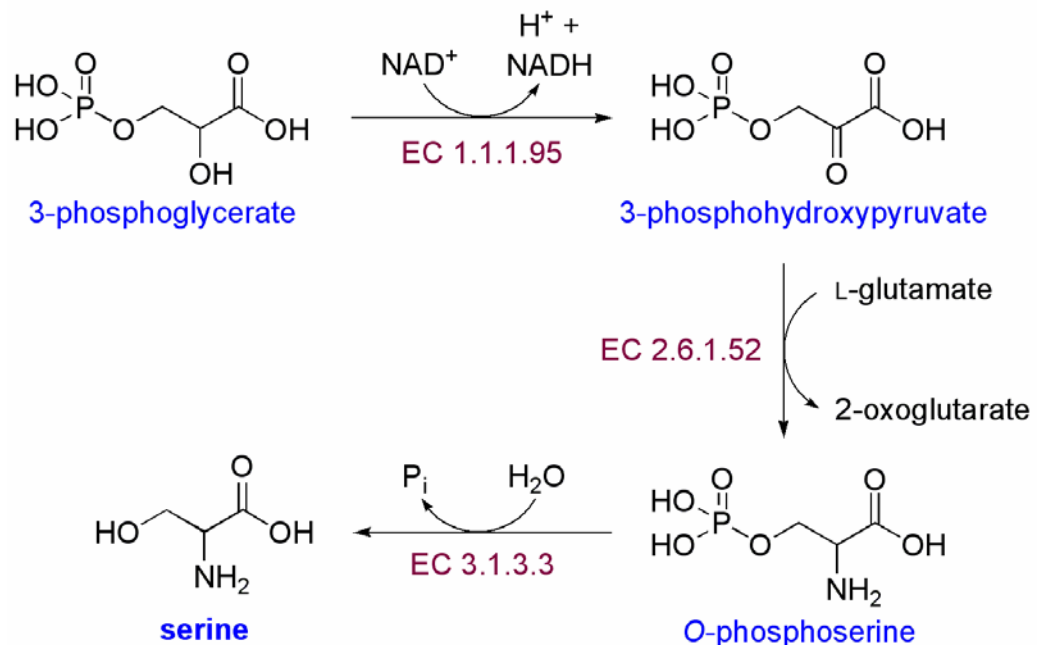
ที่มาของภาพ <http://themedicalbiochemistrypage.org/images/glycine-synthesis.jpg>

ในทางคลินิกมีการนำยาที่ออกฤทธิ์เสริมกับกลูตาเมตในการกระตุ้น NMDA receptor เช่น sarcosine (GlyT-1 blocker) ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเก็บกลับของ glycine transporter ใช้เป็น

ยารักษาผู้ป่วยโรคจิตเภท (Schizophrenia) ซึ่งเชื่อว่าสาเหตุส่วนหนึ่งมาจาก NMDA receptor ทำงานด้วยประสิทธิภาพลง (Hypofunction)

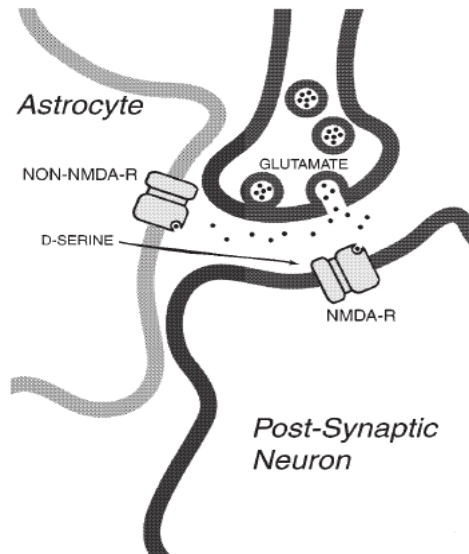
เซอรีน

เซอรีน (Serine, Ser) เป็นสารสื่อประสาทที่พบกระจายอยู่ทั่วทั้งสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มักอยู่ในรูปของ D-serine เซอรีนถูกสังเคราะห์ภายในเซลล์ค้ำจุน โดยเอนไซม์ serine racemase ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน L-serine กลายเป็น D-serine เมื่อกลูตาเมตเข้าจับกับ non-NMDA receptor ของเซลล์ค้ำจุนส่งผลต่อการกระตุ้นให้มีการหลั่งเซอรีนออกจากเซลล์ค้ำจุน เซอรีนถูกทำให้หมดฤทธิ์โดยการถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ D-amino acid oxidase (DAAOX) จากการศึกษพบว่าเซอรีนออกฤทธิ์ด้วยการเสริมฤทธิ์กับกลูตาเมตในการกระตุ้น NMDA receptor เช่นเดียวกับไกลซีน โดยเข้าจับกับที่บริเวณ glycine site โดยพบว่า NMDA receptor ที่มี glycine site มีอยู่อย่างหนาแน่นที่บริเวณ CA1 ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ดังนั้นเซอรีนและ กลูตาเมตจึงเป็น co-agonist ในการกระตุ้น NMDA receptor มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่ส่งสัญญาณประสาท



รูปที่ 7 แสดงสูตรโครงสร้างของและการสังเคราะห์เซอรีน

ที่มาของภาพ: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/63/Serine_biosynthesis.png



รูปที่ 8 แสดงการหลั่งเซอรินออกจากเซลล์ค้ำจุนและการจับกับ NMDA receptor (NMDA-R) ของ post-synaptic neuron (Snyder and Kim, 2000)

มีการนำยากลุ่มที่ออกฤทธิ์คล้ายกับ D-serine เช่น D-cycloserine ที่ออกฤทธิ์เสริมกับกลูตาเมตในการกระตุ้น NMDA receptor โดยเข้าจับกับ glycine site ได้โดยตรง ซึ่งในทางคลินิกใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยโรคจิตเภท ด้วยการลดความเสี่ยงภาวะความผิดปกติที่เกิดจาก NMDA receptor ทำงานด้อยประสิทธิภาพลง (Hypofunction) ซึ่งเชื่อว่าเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรค

การเรียนรู้และความจำ (Learning & memory)

การเรียนรู้ (learning) เป็นการได้มา (acquisition) หรือ การจัดระเบียบหรือหมวดหมู่ใหม่ (reorganization) ของสมองที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรู้และการคิด โดยผ่านกระบวนการประมวลผลของข้อมูลและการเก็บรักษาข้อมูล

ความจำ (memory) คือ ความสามารถของสมองที่จะเก็บข้อมูลต่างๆได้และระลึกได้ในโอกาสต่อมา สามารถแบ่งความจำเป็น 2 ชนิด คือ 1) ความจำชั่วคราว (short-term memory หรือ recent memory) เป็นความจำระยะสั้นๆ เก็บไว้ได้ไม่นานเพียง 2-3 นาทีก็ลืม และ 2) ความจำถาวร (long-term memory หรือ remote memory) เป็นความจำที่เก็บไว้ได้นานเป็นเดือน ปี ความจำชนิดนี้ลืมได้ยาก ถึงแม้สมองจะเกิดภาวะ hypoxia หรือได้รับยาสลบ ซึ่งทำให้การทำงานของสมองหยุดชั่วคราว ความจำชนิดนี้ก็จะยังคงจำได้เมื่อสมองกลับมาทำงานได้อย่างเดิม

สำหรับกลไกการเกิดความจำ จากการศึกษาวิจัยเชื่อว่าการเกิดความจำแบบชั่วคราวอาจเกิดจากการเกิดกระแสประสาทวิ่งวน (reverberating circuit) เมื่อมี sensory input เข้ามาถึง สมองส่วน

cerebral cortex จะเกิดกระแสประสาทวิ่งวนขึ้นทำให้เกิดความจำสั้นๆ และเมื่อกระแสประสาทนี้หายไ้ก็จะลืมความจำนั้น

ส่วนการเกิดความจำแบบถาวรเชื่อว่าเกิดจากการกระตุ้นที่ซินแนปส์ด้วยความถี่สูงแบบซ้ำๆ (tetanic stimulation) ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเซลล์ประสาทนานเป็นชั่วโมง ซึ่งในช่วงนี้ถ้ามีการกระตุ้นเซลล์ประสาทอีกจะเกิดการตอบสนองมากกว่าปกติเรียก long-term potentiation (LTP) ทำให้เกิดความจำได้ จากการทดลองพบว่า LTP จะทำให้เกิดการสะสม Ca^{2+} ที่ presynaptic terminal ซึ่งจะสามารถช่วยเพิ่มการหลั่งสารสื่อประสาทได้ นอกจากนี้ยังเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของการซินแนปส์ เช่น จำนวน presynaptic terminal ที่เพิ่มขึ้น ขนาดของ terminal ที่เพิ่มขึ้น เป็นต้น นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนและ RNA จากการทดลองในสัตว์ทดลองพบว่าเซลล์ประสาทที่ทำงานมากๆ จะมีโปรตีนและ RNA สะสมเพิ่มขึ้น หรือ การมีสารสื่อประสาท เช่น acetylcholine และฮอร์โมนบางชนิดเช่น growth hormone และ thyroid hormone ในปริมาณที่เหมาะสม ไม่มากหรือน้อยเกินไป ก็มีผลต่อการเกิดความจำแบบถาวรด้วยเช่นกัน

กระบวนการเก็บรวบรวมความจำ (consolidation of long-term memory) คือ การเก็บความจำให้อยู่ได้นานๆ ต้องอาศัยกระบวนการในสมองซึ่งกินเวลาประมาณ 1-10 นาทีหรืออาจนานถึง 1 ชั่วโมง กระบวนการเกิดการเก็บรวบรวมความจำจะต้องมีการทบทวนข้อมูลที่ได้รับเข้ามา ข้อมูลสั้นๆ จะจำได้ดีกว่าข้อมูลยาว และกระบวนการนี้เกิดขึ้นในขณะที่สมองตื่นตัวได้ดีกว่าขณะที่สมองหลับหรือไม่ตื่นตัว ขณะเกิดความตื่นเต้นหรือวิตกกังวลจะทำให้การเก็บความจำไม่ดีเท่าที่ควร การนอนหลับพักผ่อนในช่วงตากระตุกหรือช่วง REM sleep จะช่วยให้เกิดกระบวนการนี้ได้ดีขึ้น

การสูญเสียความทรงจำ (amnesia) เป็นการสูญเสียความทรงจำและ/หรือความสามารถในการเรียนรู้ สาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการสูญเสียความทรงจำก็คือภาวะที่สมองได้รับบาดเจ็บ (trauma) การที่สมองถูกกระทบกระเทือนอย่างรุนแรง, ภาวะ chronic alcoholism, ภาวะสมองอักเสบเนื่องอกในสมอง, stroke และจากความชรา

การสูญเสียความทรงจำมี 2 ลักษณะ คือ

1) retrograde amnesia เป็นการสูญเสียความทรงจำในช่วงเวลาก่อนที่สมองจะได้รับบาดเจ็บ คือ ลืมสิ่งที่เคยได้รับรู้มาแล้ว ในรายที่มีอาการรุนแรงอาจจะสูญเสีย declarative memory ในช่วงก่อนที่สมองจะได้รับบาดเจ็บโดยสมบูรณ์

2) anterograde amnesia เป็นการสูญเสียความสามารถในการจำสิ่งใหม่ๆ ที่เกิดขึ้นหลังจากที่สมองได้รับบาดเจ็บ ในรายที่มีอาการรุนแรงมากจะสูญเสียความสามารถในการเรียนรู้สิ่งใหม่ๆ โดยสมบูรณ์ ส่วนในรายที่อาการไม่รุนแรงจะทำให้เรียนรู้ช้าและต้องการการทบทวนมากกว่าปกติ ในผู้ป่วย

บางรายอาจมีอาการร่วมกันระหว่าง retrograde amnesia และ anterograde amnesia ในระดับความรุนแรงที่ต่างกัน

เมื่อเข้าสู่วัยชราจะมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคทางระบบประสาทสูงขึ้น เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) หรือสมองเสื่อม (dementia) ซึ่งการสูญเสียความทรงจำ (amnesia) ก็จะเป็นอาการที่พบได้ในผู้ป่วยโรคเหล่านี้ การสูญเสียความทรงจำที่สัมพันธ์กับความชราจะเกิดขึ้นเริ่มต้นกับความจำระยะสั้นหรือ short-term memory ผู้ป่วยจะลืมเหตุการณ์ที่เพิ่งเกิดขึ้นหรือถามคำถามซ้ำๆ ผู้ป่วยจะยืนยันว่าเหตุการณ์นั้นไม่เคยเกิดขึ้นหรือไม่เคยถามคำถามนั้นมาก่อน นอกจากนี้ผู้ป่วยจะไม่สามารถจดจำสิ่งที่คุ้นเคยได้ เช่น ชื่อของคนรัก สถานที่ที่เคยไปบ่อยๆ และเมื่ออาการของโรคดำเนินไปเรื่อยๆ ผู้ป่วยก็จะสูญเสียความจำระยะยาวหรือ long-term memory หากอาการของ amnesia ร้ายแรงมาก ผู้ป่วยจะไม่ทราบว่าเป็นใคร และจะมีบุคลิกภาพที่เปลี่ยนไป เช่น ซึมเศร้า แยกตัวจากสังคม อารมณ์แปรปรวน จากอาการดังกล่าวสามารถชี้ให้เห็นได้ว่าความชราจะสัมพันธ์กับทั้ง retrograde และ anterograde amnesia

ภาวะความจำบกพร่องในหนูทดลองด้วยสาร A β peptides และการทดสอบ

การสร้างแบบจำลองหนูเกิดภาวะสมองเสื่อมให้มีลักษณะคล้ายกับคนที่ เป็นโรคอัลไซเมอร์ในระยะเริ่มแรกคือทำให้เกิดความผิดปกติทางความจำ สามารถกระทำได้โดยการฉีดสาร amyloid β -peptides ชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น A β_{1-40} , A β_{1-42} , A β_{25-35} เข้าสู่ช่องโพรงสมองหรือสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูทดลอง การชักนำแบบนี้อาศัยข้อมูลจากการศึกษาพยาธิวิทยาทางระบบประสาทในผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ ที่พบว่ามีสาร A β peptides สะสมมากที่สมองใหญ่ซีรีบรัม และโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณสมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ ความจำ ทำให้ผู้ป่วยเหล่านี้มีความสามารถในการเรียนรู้และความจำลดลง

หลังจากทำการฉีด A β peptides แล้วหนูทดลองจะถูกนำมาทดสอบทางพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ ซึ่งวิธีทดสอบที่ใช้ทั่วไปมีหลายวิธี แต่ในที่นี้จะกล่าวถึง 2 วิธีคือ

2.1) Morris Water Maze Test เป็นการทดสอบความจำที่เกี่ยวกับสถานที่ (spatial memory) และสิ่งอ้างอิงหรือหลักการทั่วไป (memory for general principles) โดยหนูทดลองจะต้องว่ายน้ำเพื่อหาแท่นที่อยู่ใต้น้ำให้พบ ซึ่งแท่นที่อยู่ใต้น้ำจะวางในตำแหน่งที่อยู่ใกล้กับสัญลักษณ์อันหนึ่ง มีการบันทึกเวลาที่หนูทดลองใช้ในการว่ายน้ำเพื่อหาแท่นใต้น้ำและเวลาที่ใช้นอนอยู่ในบริเวณเดิม หลังจากที่มีการเปลี่ยนที่ของแท่นใต้น้ำไปยังอีกบริเวณหนึ่ง โดยทั่วไป ช่วงแรกของการฝึกหนูทดลองจะว่ายน้ำวนและใช้เวลานานในการหาแท่น แต่หลังจากที่ถูกฝึกให้ว่ายน้ำหาแท่นอย่างนี้ซ้ำๆ กันทุกวันเป็นเวลาอย่างน้อย 1 อาทิตย์ หนูจะใช้เวลาน้อยลงและว่ายน้ำตรงไปที่แท่นทันที เนื่องจากการเรียนรู้ซ้ำๆ จะถูกเปลี่ยนเป็นความจำที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส ทำให้หนูสามารถจดจำสถานที่วางแท่นใต้น้ำได้

2.2) Novel object recognition test เป็นการทดสอบความสามารถในการจดจำสิ่งของ โดยใช้หลักการที่ว่าธรรมชาติของหนู มีความอยากรู้อยากเห็นเมื่อพบสิ่งใหม่ๆ มักจะใช้เวลาในการสำรวจสิ่งของใหม่ๆ มากกว่าวัตถุสิ่งของที่คุ้นเคยหรือเคยพบมาก่อน ในการทดลอง หากมีการทดสอบโดยให้สิ่งของใหม่ปนกับสิ่งของเดิมที่หนูเคยสำรวจแล้ว หนูปกติมักจะใช้เวลาสำรวจสิ่งของใหม่มากกว่าสิ่งของเดิมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ถ้าหากหนูใช้เวลาในการสำรวจของทั้งสองสิ่งไม่ต่างกันแสดงว่าความสามารถในการจดจำสิ่งของไม่ดี

วิธีการทั้ง 2 วิธีดังกล่าวเป็นที่ยอมรับในการศึกษาวิจัยทางพฤติกรรมที่เกี่ยวกับการเรียนรู้และความจำ ซึ่งหากเปรียบเทียบกับมนุษย์ที่เกิดภาวะความจำบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ ผู้ป่วยมักจะสูญเสียความจำเกี่ยวกับสถานที่คือลืมว่าบ้านอยู่ที่ใด มีอาการหลงทาง และกลับบ้านไม่ถูก และนอกจากนี้ผู้ป่วยจะมีความสามารถในการจดจำสิ่งของลดลง

เนื่องจากยังไม่มีงานวิจัยใดที่ระบุว่าการบริโภคกล้วยส่งผลอย่างไรต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง สามารถช่วยลดความวิตกกังวล หรือช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำได้หรือไม่ โครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาผลของการได้บริโภคกล้วยเป็นระยะเวลาในการต้านอาการวิตกกังวล ผลในการกระตุ้นหรือลดการทำงานของระบบประสาท ผลในการเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาทชนิดกลูตาเมตและกรดอะมิโนอื่นๆ ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งเป็นสมองส่วนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเรียนรู้และความจำ โดยการวิเคราะห์สารสื่อประสาทด้วยเครื่อง HPLC และ fluorescence detector ซึ่งถ้ามีการเปลี่ยนแปลงในทางเพิ่มขึ้นของสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้น ได้แก่ กลูตาเมต ในระดับที่ไม่สูงมากจนผิดปกติ อาจบ่งบอกถึงผลดีในแง่ของพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ แต่ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงในทางเพิ่มขึ้นของสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง ได้แก่ ไกลซีน และกาบา อาจบ่งบอกถึงผลดีในแง่ของการช่วยทำให้ซึมและลดการแสดงพฤติกรรมต่างๆ ลง นอกจากนี้ข้อมูลจาก chromatogram ที่ได้จะมีค่าของระดับสารสื่อประสาทอื่นๆ ที่พบในสมองอีก อาทิเช่น แอสพาเตต เซอรีน เป็นต้น ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการทำงานของสมองที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำและการทำงานด้านอื่นๆ รวมทั้งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ยังทำการวัดระดับของซีโรโทนินในสมองหลังจากได้รับกล้วยเป็นระยะเวลาานด้วย ซึ่งส่วนนี้ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้ จะทำให้ทราบข้อมูลหรือคุณค่าของกล้วยในเชิงวิทยาศาสตร์ เพื่อสนับสนุนให้การบริโภคกล้วยและทำให้กล้วยมีมูลค่าเพิ่มขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นหนูขาวเพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม หนูทดลองทุกตัวถูกนำไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงหนูทดลองของคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีการควบคุมอุณหภูมิของห้องประมาณ 25.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส มีระบบการควบคุมแสงสว่างอย่างเหมาะสม ในแต่ละวันกำหนดช่วงเวลาที่เปิดไฟตั้งแต่ 6.00 -18.00 น. หนูทดลองทุกตัวจะได้รับอาหารเม็ดและน้ำสะอาดอย่างบริบูรณ์ การเปลี่ยนวัสดุรองนอนนั้นจะเปลี่ยนใหม่วันเว้นวัน หรือเมื่อตรวจพบว่าชื้นแฉะหรือสกปรก หลังจากที่ได้รับหนูทดลองจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ หนูทดลองทุกตัวจะต้องได้พักฟื้น และปรับตัวให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนทำการทดลอง

การแบ่งกลุ่มหนูทดลอง

หนูทดลองที่นำมาใช้ในการทดลองชุดแรกมีจำนวน 40 ตัว และเนื่องจากเป็นการศึกษาทางประสาทพฤติกรรมศาสตร์จึงมีความจำเป็นต้องเพิ่มจำนวน N เพื่อลดความแปรผันของข้อมูล ดังนั้นในหนูชุดที่สองได้ทำการทดลองเพิ่มกลุ่มๆละ 4 ตัว รวมทั้งเพิ่มหนูอีก 1 กลุ่มที่ป้อนกล้วยขนาดสูง จำนวนหนูชุดที่สองจึงใช้หนูจำนวน 32 ตัว รวมทั้งหมด 72 ตัว โดยจะแบ่งเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

- 1) กลุ่มควบคุม sham (control sham) เป็นกลุ่มควบคุมปกติ ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำเกิดภาวะให้เกิดความบกพร่อง ได้รับการผ่าตัดและฉีดน้ำเกลือ (0.9%NaCl) ซึ่งเป็นตัวทำลายสำหรับ $A\beta_{25-35}$ เข้าที่โพรงสมอง และถูกป้อนน้ำบริสุทธิ์ จำนวน $8+4=12$ ตัว
- 2) กลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (control $A\beta$) เป็นกลุ่มความจำบกพร่องควบคุมที่ถูกเหนี่ยวนำเกิดภาวะให้เกิดความบกพร่อง โดยการฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ ที่โพรงสมอง และถูกป้อนน้ำบริสุทธิ์ จำนวน $8+4=12$ ตัว
- 3) กลุ่มทดสอบกล้วยขนาดต่ำ ($A\beta+BN$ 0.5) เป็นกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำเกิดภาวะให้เกิดความบกพร่องโดยการฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ ที่โพรงสมอง และถูกป้อนกล้วยขนาด 0.5 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว จำนวน $8+4=12$ ตัว
- 4) กลุ่มทดสอบกล้วยขนาดกลาง ($A\beta+BN$ 5) เป็นกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำเกิดภาวะให้เกิดความบกพร่องโดยการฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ ที่โพรงสมอง และถูกป้อนกล้วยขนาด 5 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว จำนวน $8+4=12$ ตัว

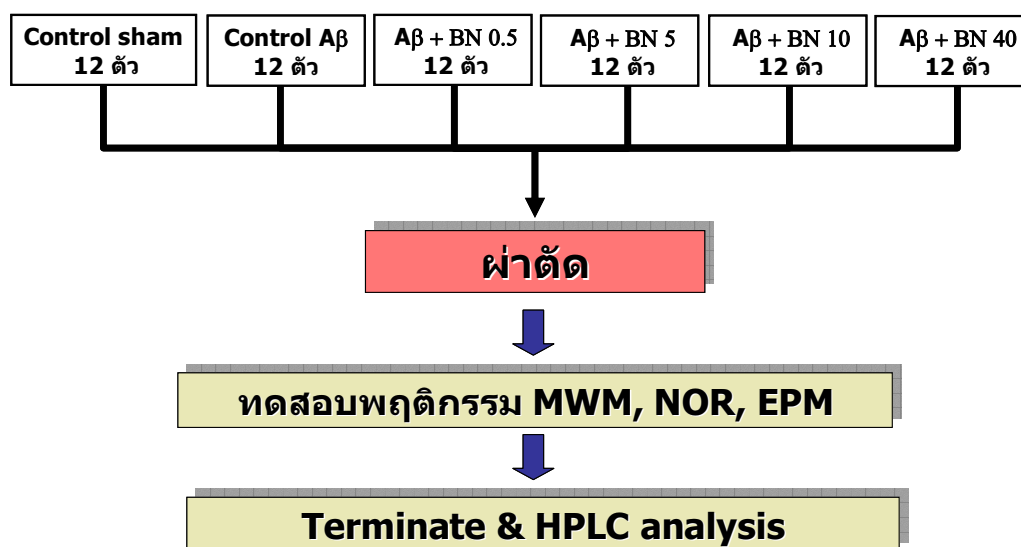
5) กลุ่มทดสอบกัวยขนาดสูง ($A\beta$ +BN 10) เป็นกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำเกิดภาวะให้เกิดความบกพร่องโดยการฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ ที่โพรงสมอง และถูกป้อนกัวยขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว จำนวน $8+4=12$ ตัว

6) กลุ่มทดสอบกัวยขนาดสูงสุด ($A\beta$ +BN 40) เป็นกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำเกิดภาวะให้เกิดความบกพร่องโดยการฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ ที่โพรงสมอง และถูกป้อนกัวยขนาด 40 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว จำนวน 12 ตัว

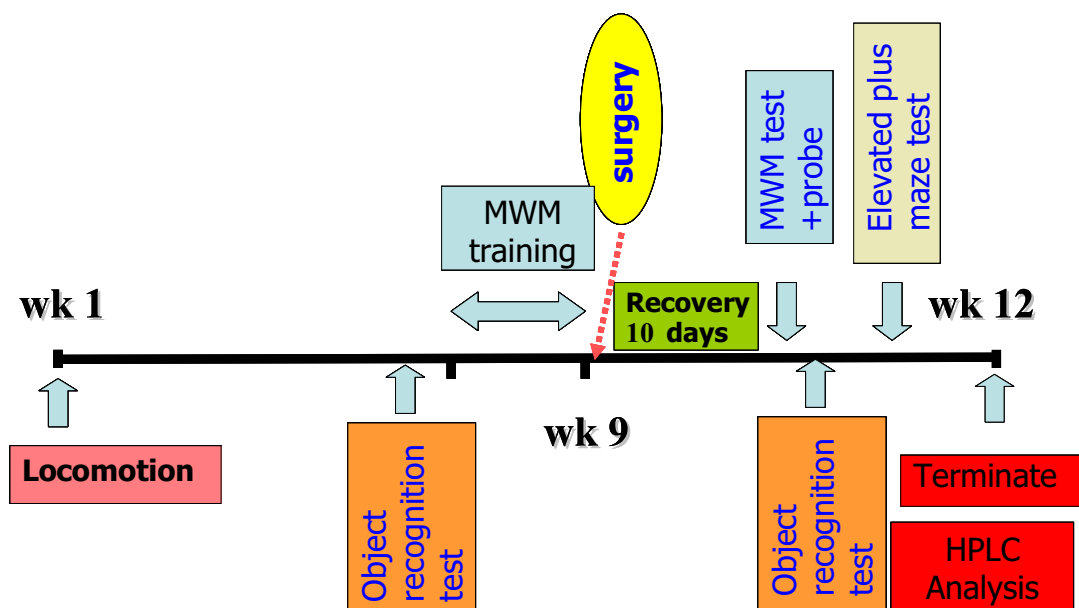
หนูทดลองทุกกลุ่มจะได้รับการชั่งและบันทึกน้ำหนักตัว สัปดาห์ละครั้ง ทุกสัปดาห์ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการขออนุมัติการทำวิจัยในสัตว์จากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวร (ดังภาคผนวก หน้า ที่ 97) และได้ปฏิบัติตามจริยบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ตามแนวทางของสมาคมวิจัยแห่งชาติ



แผนผังที่ 1 การแบ่งกลุ่มหนูทดลองสายพันธุ์ Sprague-Dawley (S.D.) ออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว ได้แก่ 1) กลุ่มควบคุม sham (Control Sham) 2) กลุ่มควบคุมความจำบกพร่อง (Control- $A\beta$) 3) กลุ่มที่ได้รับกัวยขนาด 0.5 ก./กก. ($A\beta$ +BN0.5) 4) กลุ่มที่ได้รับกัวยขนาด 5 ก./กก. ($A\beta$ +BN5) 5) กลุ่มที่ได้รับกัวยขนาด 10 ก./กก. ($A\beta$ +BN10) 6) กลุ่มที่ได้รับกัวยขนาด 40 ก./กก. ($A\beta$ +BN40) หนูทุกกลุ่มถูกนำมาทดสอบพฤติกรรมต่างๆ หลังจากผ่าตัดและพักฟื้น เมื่อทดสอบพฤติกรรมทุกอย่างเสร็จแล้วจะถูกนำมาสลบลึกและผ่าตัดแยกส่วนสมองออกมาเพื่อทำการวิเคราะห์ทางชีวเคมีเพื่อหาปริมาณสารสื่อประสาทชนิดต่างๆ ต่อไป



ป้อนน้ำ/กลัวยบด วันละ 1 ครั้ง นาน 90 วัน

แผนผังที่ 2 ลำดับขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ของกลัวยในการฟื้นฟูภาวะความจำบกพร่องและฤทธิ์ด้านความกังวลในหนูแรท โดยเริ่มจากการป้อนกลัวยบดหรือน้ำ ในวันแรกจะทำการวัดพฤติกรรมเคลื่อนไหวน (locomotion) หลังจากนั้นจะทำการป้อนต่อไปทุกวันติดต่อกัน หลังจากที่ได้รับกลัวยบดหรือน้ำประมาณ 2 เดือน หนูทุกตัวจะถูกนำมาทดสอบความจำด้วย object recognition test และถูกนำมาเริ่มทำการฝึก Morris water maze 1 สัปดาห์ ก่อนทำการผ่าตัดเพื่อฉีด A β peptides เข้าในโพรงสมอง (A β , i.c.v.) เพื่อชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องในหนู 4 กลุ่มหรือฉีดตัวทำละลายในหนู 1 กลุ่ม (Control Sham) หลังจากผ่าตัด 10 วัน เมื่อหนูพักฟื้นดีแล้ว จะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันความจำบกพร่องโดย Morris water maze test และ probe trial (ไม่มีแท่น) ตามด้วย object recognition test และทดสอบฤทธิ์ด้านความกังวลด้วย elevated plus maze และจะถูกทำให้ตายอย่างสงบ เพื่อแยกเนื้อสมองมาศึกษาทางชีวเคมี (biochemical study) และตรวจหาปริมาณสารสื่อประสาทชนิดต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC และ fluorescence detector หรือ UV detector

การเตรียมกล้วยบด

กล้วยน้ำว้าสุกซื้อจากตลาดกลางผลไม้ จ.พิษณุโลก นำมาปอกเปลือกออก และชั่งน้ำหนักเฉพาะส่วนเนื้อกล้วยตามสัดส่วนปริมาณกล้วยที่จะป้อนให้แก่หนูทดลอง ซึ่งคิดจากค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวหนูในแต่ละกลุ่มที่ได้ชั่งน้ำหนักอาทิตย์ละครั้ง (ตารางที่ 1) จากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่น Moulinex® จนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน การป้อนน้ำกลั่นหรือน้ำกล้วยบดจะป้อนโดยทางปาก ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 1 มล. (รูปที่ 9) ป้อนทุกวัน วันละหนึ่งครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือน

ในการทดลองนี้ศึกษาผลของการให้กล้วย 3 ขนาด คือ 1) ขนาดต่ำ จะได้รับกล้วย 0.5 ก./กก. น้ำหนักตัว 2) ขนาดปานกลาง จะได้รับกล้วย 5 ก./กก. น้ำหนักตัว และ 3) ขนาดสูง จะได้รับกล้วย 10 ก./กก. น้ำหนักตัว ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในหนูชุดที่สอง ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มในหนูอีก 1 กลุ่ม โดยให้ได้รับกล้วยขนาดสูงมาก คือ 40 ก./กก. น้ำหนักตัว ขนาดของกล้วยที่ใช้ในการทดลองนี้ปรับมาจากการศึกษาวิจัยของ Yin และคณะ (Yin et al., 2008)

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักเฉลี่ยของหนูแต่ละกลุ่มและปริมาณกล้วยบดที่ป้อน

		week 1	week 2	week 3	week 4	week 5	week 6
กลุ่ม Ab+BN 0.5	น้ำหนักเฉลี่ย	343.31	388.63	407.64	417.21	457.96	476.16
	ปริมาณกล้วย (กรัม)	0.17	0.19	0.20	0.21	0.23	0.24
กลุ่ม Ab+BN 5	น้ำหนักเฉลี่ย	368.10	386.76	406.10	430.55	448.22	449.36
	ปริมาณกล้วย (กรัม)	1.84	1.93	2.03	2.15	2.24	2.25
กลุ่ม Ab+BN 10	น้ำหนักเฉลี่ย	333.53	370.09	391.20	425.67	450.66	463.70
	ปริมาณกล้วย (กรัม)	3.34	3.70	3.91	4.26	4.51	4.64
กลุ่ม Ab+BN 40	น้ำหนักเฉลี่ย	353.95	371.10	391.33	421.07	435.49	447.8
	ปริมาณกล้วย (กรัม)	14.16	14.84	15.65	16.84	17.42	17.91
		week 7	week 8	week 9	week 10	week 11	week 12
กลุ่ม Ab+BN 0.5	น้ำหนักเฉลี่ย	491.42	504.71	416.71	510.38	518.94	515.98
	ปริมาณกล้วย (กรัม)	0.25	0.25	0.21	0.26	0.26	0.26
กลุ่ม Ab+BN 5	น้ำหนักเฉลี่ย	500.51	512.04	514.57	516.12	523.56	516.68
	ปริมาณกล้วย (กรัม)	2.50	2.56	2.57	2.58	2.62	2.58
กลุ่ม Ab+BN 10	น้ำหนักเฉลี่ย	480.37	518.10	506.97	509.25	529.29	516.31
	ปริมาณกล้วย (กรัม)	4.80	5.18	5.07	5.09	5.29	5.16
กลุ่ม Ab+BN 40	น้ำหนักเฉลี่ย	460.82	467.96	478.48	491.61	500.41	510.86
	ปริมาณกล้วย (กรัม)	18.43	18.72	19.14	19.66	20.02	20.43



รูปที่ 9 แสดงการป้อนกล้วยบดให้หนูทดลองด้วยหลอดฉีดยาขนาด 1 มล.

การทดสอบผลของกล้วยต่อพฤติกรรมในสัตว์ทดลอง

ในการทดลองนี้จะเน้นศึกษาฤทธิ์ของกล้วยในการต้านความวิตกกังวลและความสามารถในการเรียนรู้และความจำดังนี้

1. Locomotor activity test การทดสอบพฤติกรรมการเคลื่อนไหวนี้จะทำการทดสอบในวันแรกของการได้รับกล้วยบด โดยหนูแต่ละตัวจะถูกป้อนน้ำ (กลุ่ม control sham) หรือกล้วยบดขนาดต่างๆ คือ 0.5, 5, 10 มก./กก.น้ำหนักตัว (ยกเว้นในกลุ่มที่ได้กล้วยบดขนาด 40 ก./กก.น้ำหนักตัว เนื่องจากไม่สามารถป้อนกล้วยบดทั้งหมดในคราวเดียวกันได้) แล้วปล่อยให้หนูเคลื่อนไหวอย่างอิสระภายในกล่องศึกษาพฤติกรรม ซึ่งทำด้วยแผ่นพลาสติกขนาด กว้าง 40 ซม. ยาว 40 ซม. และสูง 50 ซม. จับเวลาจนกระทั่งครบ 60 นาที จึงเสร็จสิ้นการทดลอง การเคลื่อนไหวของหนูทดลองจะถูกบันทึกโดยกล้องวิดีโอที่ต่อเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์ไว้แล้วนำมาวิเคราะห์ผลภายหลังด้วยโปรแกรม ANYMAZE (Stoelting Co., USA) เพื่อดิจิไทซ์ข้อมูลการเคลื่อนไหว (locomotive behavior) ซึ่งโปรแกรมจะคำนวณหาค่าพารามิเตอร์เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหว เช่น ระยะทางทั้งหมดของการเคลื่อนไหว และความเร็วเฉลี่ย เป็นต้น

2. Elevated plus maze Test เป็นการทดสอบฤทธิ์ด้านความกังวลในหนูทดลอง ซึ่งถูกคิดค้นโดย File และคณะในปี ค.ศ. 1985 (Pellow, et al., 1985) โดยใช้อุปกรณ์ที่เป็นทางเดินรูปกากะบาท (plus maze) ขนาดความกว้างของทางเดินเท่ากับ 10 ซม. มีผนังสูง 30 ซม. กั้นเฉพาะทางเดิน 2 ทางที่อยู่ตรงกันข้ามกัน (closed arms) ส่วนทางเดินอีก 2 ทางไม่มีผนังกั้น (open arms) ตัว maze จะยกสูงจากพื้นประมาณ 50 ซม. (รูปที่ 10) การทดลองจะใช้เวลา 5 นาที เริ่มต้นจากการปล่อยหนูบริเวณตรงกลางของกากะบาทโดยปกติหนูแสดงพฤติกรรมสำรวจโดยเดินเข้าทุกๆ แขน ซึ่งเมื่อมันเดินบนแขนที่ไม่มีผนังกั้น หนูจะรู้สึกหวาดกลัว กังวล (anxiety) และจะไม่เลือกเข้าแขนที่ไม่มีผนังกั้นทั้งสองแขนอีก ทำการนับจำนวนครั้งที่หนูเข้าแขนแต่ละแขนภายในเวลา 5 นาที

ในการทดสอบนี้ได้ทำการทดสอบยาอีก 2 ชนิดโดยใช้หนูปกติ โดยหนูเหล่านี้จะได้รับยา fluoxetine (หรือมีชื่อการค้าว่า Oxetine 20) ซึ่งนิยมใช้ในการรักษาโรคซึมเศร้า ขนาด 10 มก./กก. น้ำหนักตัวหรือ Diazepam ซึ่งเป็นยาลดความวิตกกังวล ขนาด 2 มก./กก.น้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการทดสอบพฤติกรรม ทำการจดบันทึกข้อมูลจำนวนครั้งของการเข้าแขนและระยะเวลาที่ใช้เปรียบเทียบผลที่ได้กับกับหนูแต่ละกลุ่ม



รูปที่ 10 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ Elevated plus maze Test

3. Novel Object Recognition (NOR) Test เป็นการทดสอบความคุ้นเคยต่อวัตถุที่เคยเห็นหรือสัมผัสก่อนหน้านี้ในเวลาผ่านไปเพียงไม่กี่นาที ว่าสามารถจำได้หรือไม่ ซึ่งตามธรรมชาติหนูจะเป็นสัตว์ที่มีนิสัยอยากรู้อยากเห็นในสิ่งใหม่ๆ (novel object) เปรียบเสมือนกับ exploratory behavior อย่างหนึ่ง ในการทดลองนี้จะดำเนินการ 2 ครั้งคือก่อนผ่าตัดและ 14 วันหลังการผ่าตัด

การทดสอบ Novel object recognition แบ่งเป็น 2 ช่วง ดังรูปที่ 11 คือ

3.1 Training phase ในระยะนี้หนูทดลองแต่ละตัวจะถูกปล่อยบริเวณตรงกลางระหว่างวัตถุที่มีรูปร่าง สี และขนาดที่แตกต่างกัน 2 ชิ้น (วัตถุ A และ วัตถุ B) และปล่อยให้หนูทดลองสำรวจวัตถุอย่างอิสระโดยให้เวลาในการสำรวจวัตถุทั้งสิ้น 5 นาที ผู้วิจัยบันทึกเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น โดยการสำรวจวัตถุของหนูทดลองในการทดสอบนี้จะหมายถึง การที่หนูทดลองใช้จมูกเข้าไปใกล้วัตถุน้อยกว่า 2 เซนติเมตร หรือการที่จมูกของหนูทดลองสัมผัสกับวัตถุ แต่จะไม่จับเวลาในช่วงที่หนูทดลองเดินรอบๆ หรือนั่งบนวัตถุ

ค่าดัชนีความชอบวัตถุของหนูแต่ละตัวคิดได้จาก

$$\text{Preference index} = [T_A / (T_A + T_B)] \times 100$$

โดยที่ T_A เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้น A

T_B เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้น B

เมื่อครบกำหนดเวลา 5 นาทีแล้วหนูทดลองจะถูกนำกลับเข้ากรงและพักเป็นเวลา 10 นาที ในระหว่างนี้ผู้ทดสอบจะทำความสะอาดบริเวณทั้งหมดและวัตถุทั้งสองชิ้นด้วยน้ำยาทำความสะอาด

จากนั้นผู้ทดสอบนำวัตถุ A หรือ familiar object ซึ่งเป็นวัตถุเดิม มาวางที่ตำแหน่งเดิม และวัตถุ C หรือ novel object ซึ่งเป็นวัตถุใหม่ มาวางแทนที่วัตถุ B

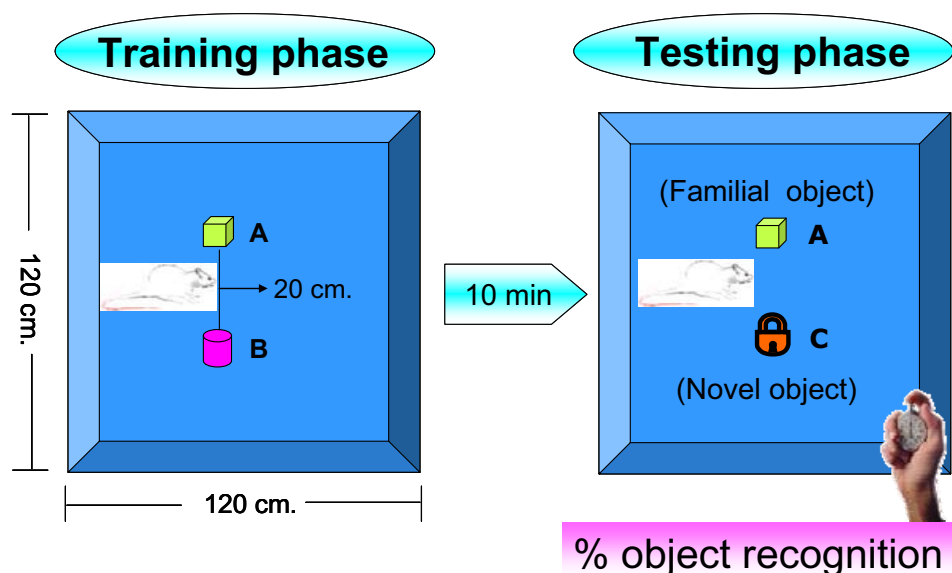
3.2 Testing phase หนูทดลองแต่ละตัวจะถูกปล่อยบริเวณตรงกลางระหว่างวัตถุ 2 ชิ้น คือ วัตถุ A และ วัตถุ C และปล่อยให้หนูทดลองสำรวจวัตถุอย่างอิสระโดยจะใช้เวลาหนูทดลองสำรวจวัตถุทั้งสิ้น เป็นเวลา 5 นาที ผู้ทดสอบบันทึกเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น เช่นเดียวกับการทดสอบในระยะ training phase เมื่อครบกำหนดเวลาหนูทดลองจะถูกนำกลับเข้ากรง ผู้ทดสอบนำข้อมูลระยะเวลาในการสำรวจวัตถุเดิม (A) และวัตถุใหม่ (C) มาคำนวณค่าดัชนีความจำของหนูแต่ละตัวซึ่งคิดได้จากสูตร

$$\text{Recognition index} = [T_C / (T_A + T_C)] \times 100$$

โดยที่ T_A เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้น A ในช่วง Testing phase

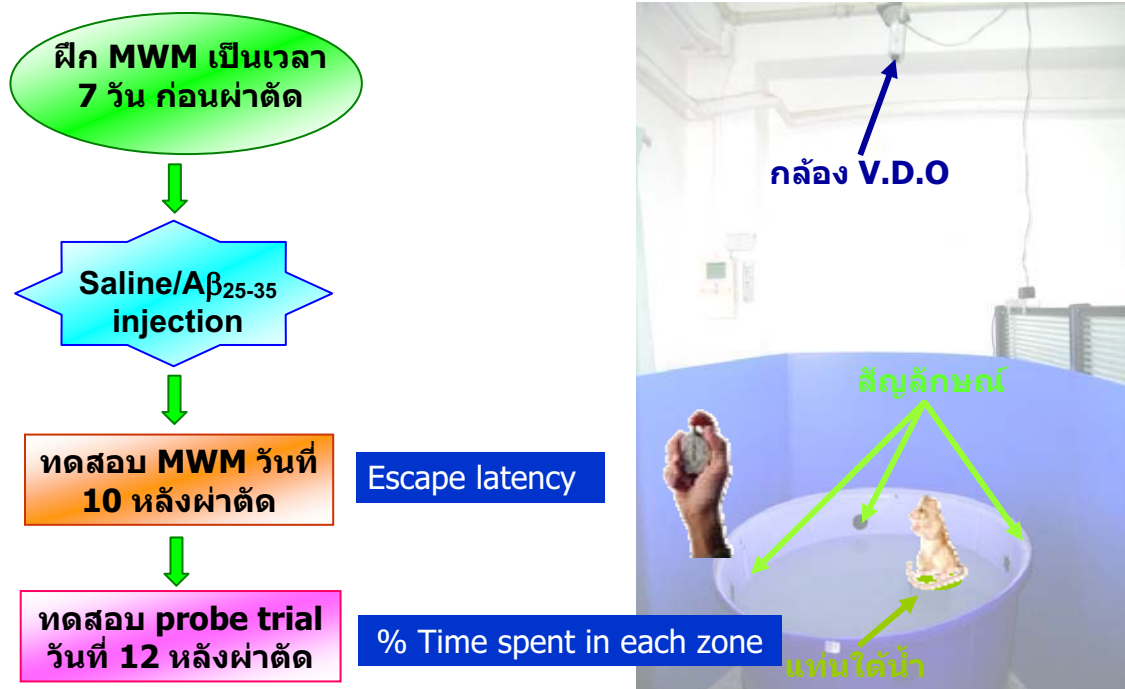
T_C เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้น C ในช่วง Testing phase

หนูในกลุ่มควบคุมปกติจะมีความสามารถในการเรียนรู้และความจำชนิดนี้เป็นปกติคือจะใช้เวลาในการสำรวจวัตถุชิ้นใหม่มากกว่าสำรวจวัตถุชิ้นเก่าอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูทดลองในกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องจะใช้ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุชิ้นใหม่พอกับวัตถุชิ้นเก่าหรือวัตถุชิ้นเก่ามากกว่าชิ้นเก่าในช่วง Testing phase ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหนูทดลองในกลุ่มดังกล่าวมีความบกพร่องของความสามารถในความจำที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกแยกแยะสิ่งที่คุ้นเคยมาก่อน



รูปที่ 11 แสดงขั้นตอนและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบการจดจำวัตถุสิ่งของโดยวิธี NOR test

4. Morris water maze (MWM) Test เป็นการทดสอบความจำเกี่ยวกับทิศทางและสถานที่ (spatial memory) การทดสอบเริ่มจากการปล่อยหนูทดลองให้คุ้นเคยกับการว่ายน้ำในอ่างทรงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 100 ซม. เป็นเวลาประมาณ 90 วินาทีในวันแรก (รูปที่ 12) วันต่อมาจะฝึกให้หนูว่ายน้ำหาแท่นวันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันนาน 7 วัน โดยทำการปล่อยตามสัญลักษณ์ทั้งหมด 3 จุด (ยกเว้นจุดหรือ zone ที่มีแท่นได้น้ำอยู่) ให้หนูว่ายน้ำหาแท่น โดยจะวางแท่นได้น้ำไว้ในอ่างทรงกลม และจะจับเวลาตั้งแต่ปล่อยหนูทดลองจนกระทั่งหนูทดลองค้นหาแท่นได้น้ำเจอเป็นค่า escape latency ซึ่งจะกำหนดเวลาไว้ไม่เกิน 90 วินาที จากนั้นจะปล่อยให้หนูทดลองอยู่บนแท่นเป็นเวลาไม่เกิน 10 วินาที หากหนูทดลองตัวใดที่ไม่สามารถค้นหาแท่นได้น้ำเจอภายในเวลา 90 วินาที ผู้วิจัยจะจับให้หนูขึ้นอยู่บนแท่น เป็นเวลานาน 10 วินาที ทำการบันทึกค่าเวลาที่หนูทดลองใช้ในการว่ายน้ำเพื่อหาแท่นได้น้ำ (escape latency) และในวันสุดท้ายจะทำการทดสอบแบบ probe trial โดยจะนำแท่นออก และจับเวลาที่หนูว่ายน้ำในแต่ละโซนหรือ quadrant เพื่อที่จะเช็คดูความสามารถของหนูในการดึงเอาความจำเก่าที่เคยเรียนรู้เกี่ยวกับตำแหน่งของแท่นออกมาใช้ (retention memory) ผู้วิจัยบันทึกภาพเคลื่อนไหวโดยใช้กล้องวิดีโอวงจรปิดสำหรับวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมวิเคราะห์พฤติกรรม AnyMaze ภายหลัง



รูปที่ 12 แสดงขั้นตอนและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ โดยใช้ MWM Test

การผ่าตัดเพื่อทำให้หนูเกิดความจำบกพร่อง (memory impairment)

การเตรียม Amyloid- β peptide

ในการทดลองนี้จะใช้สาร Amyloid β -protein fragment 25-35 ($A\beta_{25-35}$: Sigma) เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูเกิดภาวะความจำบกพร่องโดยนำสาร $A\beta_{25-35}$ มาละลายใน 0.9% normal saline (0.9 % NaCl) ที่ผ่านการกรองด้วยตัวกรอง (filter membrane) ขนาด 0.22 ไมโครมิลลิเมตร เตรียมให้มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ 1 ไมโครลิตร แบ่งเป็นส่วนๆ และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ ก่อนนำมาใช้ต้องนำสารละลาย $A\beta_{25-35}$ ที่ได้มา incubate ใน water bath ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมงเพื่อให้สารละลาย $A\beta_{25-35}$ เกิดการเกาะกลุ่ม (aggregation) กลายเป็น amyloid plaques ทำการตรวจเช็คได้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นลักษณะการเกาะกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 13

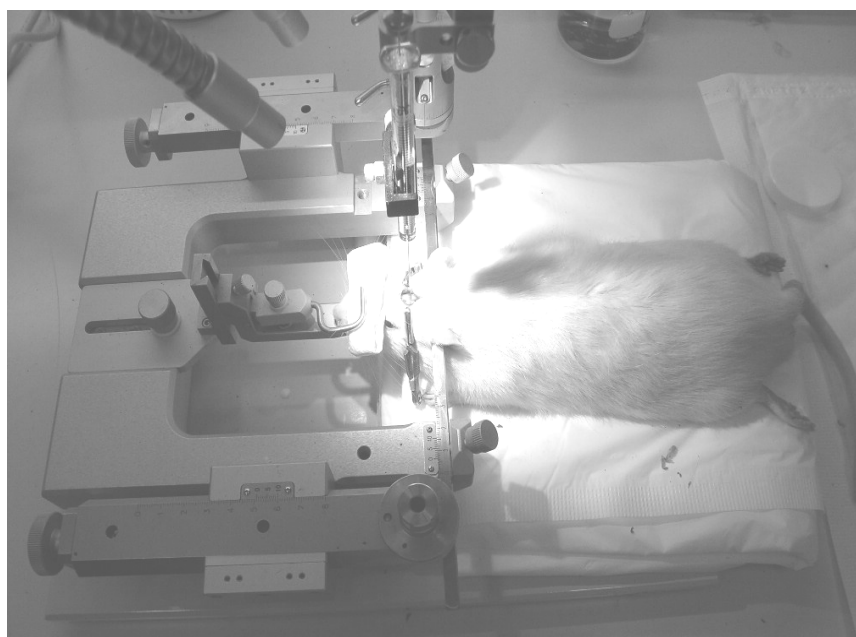


รูปที่ 13 แสดงการเกาะกลุ่มกัน (aggregation) ของ amyloid β -protein fragment $_{25-35}$ ภายหลังจากการ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (สเกลเท่ากับ 500 ไมครอน)

การผ่าตัด (Surgery)

เริ่มจากการฉีดยา atropine sulphate (Union Drug Laboratories LTD.) 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวให้หนูทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection, SC) เพื่อลดผลข้างเคียงที่เกิดจากยาสลบ จากนั้นฉีด pentobarbital sodium หรือ Nembutal™ (CEVA Animal Health Ltd.) ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวหนู โดยการฉีดเข้าที่ช่องท้อง (intraperitoneal injection, IP) เมื่อหนูสลบดีแล้วจะโกนขนบริเวณศีรษะและยึดตรึงส่วนศีรษะด้วยเครื่องยึดตรึงกะโหลกศีรษะ

(stereotaxic apparatus, model 51603, Stoelting Co. Ltd., USA) ทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70% และผ่าตัดเปิดหนังศีรษะ (midline incision) ทำการขูดเนื้อเยื่อและฟังฟัดที่ปกคลุมกะโหลกศีรษะออกให้หมด หาพิกัดตำแหน่งอ้างอิง (bregma) ที่กะโหลกศีรษะหนูและเจาะรูบนกะโหลกศีรษะหนู โดยใช้สว่านความเร็วสูง (dental drill) และดอกสว่านขนาดเล็ก โดยเจาะรูบริเวณพิกัด anteroposterior (AP) = -0.8 มม. และ mediolateral (ML) = $\pm$ 1.5 มม. โดยจะทำการเจาะทั้ง 2 ข้างของกะโหลก (bilateral) แล้วทำการฉีดสาร A β peptide (amnesia group) หรือ saline (sham group) 20 ไมโครลิตรด้วยเข็มขนาด 25 ไมโครลิตร (Hamilton syringe) ในแต่ละตำแหน่งที่ระดับความลึก 3.5 มม. ได้ระดับผิวเนื้อสมอง ปล่อยให้เข็มอยู่บริเวณนั้นนาน 3 นาที ก่อนถอนเข็มออกอย่างช้าๆ ปิดรูทั้งหมดด้วย bone wax และใส่ยาฆ่าเชื้อโรคก่อนทำการเย็บปิดแผล ในการฉีดรวม 2 จุด คิดเป็นปริมาตรทั้งหมด 40 ไมโครลิตร จากนั้นให้หนูทดลองพักฟื้นเป็นเวลา 10 วัน ก่อนนำมาทำการทดสอบพฤติกรรมตามวิธีที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น



รูปที่ 14 เครื่องมือยึดตรึงศีรษะ (stereotaxic apparatus) สำหรับการผ่าตัดสมองเพื่อฉีดสาร amyloid β peptide ที่โพรงสมอง

กระบวนการจัดการเกี่ยวกับซากสัตว์

เมื่อสิ้นสุดการทดสอบทางด้านพฤติกรรมแล้วหนูทุกตัวจะถูกทำให้ตายโดยการฉีดสลบเพื่อทำให้สลบลึกก่อนทำการผ่าตัดเพื่อแยกเอาส่วนของสมองมาทำการศึกษาวิจัยทางชีวเคมี ซากหนูทดลองทุกตัวจะถูกนำไปใส่ในถุงอย่างมิดชิดและนำไปเก็บไว้ในช่องแข็ง -20 องศาเซลเซียส เพื่อบรรจุการนำไปกำจัดด้วยวิธีการฝังกลบในที่ที่เหมาะสมต่อไป

การวัดระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

หลังจากเสร็จสิ้นการทดสอบพฤติกรรมต่างๆ หนูทุกกลุ่มจะถูกฉีดยาสลบเกินขนาดและถูกผ่าตัดเพื่อแยกเอาส่วนของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ออกมาอย่างรวดเร็ว ในหนูทดลองชุดแรกได้แยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัสทั้งสองข้างเติม phosphate buffer และปั่น centrifuge ที่ 15000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาประมาณ 15 นาที จนได้ supernatant ของสมอง เก็บตัวอย่าง supernatant ที่อุณหภูมิ -80 °C ทำการวิเคราะห์หาระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโน ด้วยเครื่อง HPLC ที่ต่อพ่วงกับ detector fluorescence ได้ และทำการวิเคราะห์หาระดับสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนินและโดปามีน ด้วยเครื่อง HPLC ที่ต่อกับ detector UV ตาม protocol ที่ผ่านการทำ standard แล้วได้ผล แต่ปรากฏว่าการวิเคราะห์ตาม protocol ดังกล่าวไม่สามารถตรวจพบสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนินและโดปามีนใน supernatant ที่เก็บไว้ได้ เนื่องจากปริมาณของสารมีน้อยกว่า detection limit ของเครื่อง HPLC และ detector UV ที่จะวิเคราะห์ได้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ปรับ protocol เพื่อให้สามารถวิเคราะห์สารซีโรโทนินและโดปามีนในระดับต่ำๆมากได้ ดังนั้นในหนูทดลองชุดที่สอง ผู้วิจัยได้ทำการแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัส 1 ข้างเพื่อนำมาเติม phosphate buffer สำหรับวิเคราะห์หาระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโน ส่วนอีก 1 ข้างนำมาเติม 0.1 M percholic acid สำหรับวิเคราะห์หาสารซีโรโทนินและโดปามีน ด้วยเครื่อง HPLC ที่ต่อพ่วงกับ detector fluorescence ได้

การวิเคราะห์ปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนได้แก่ แอสปาเตท กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา เป็นต้น จะทำโดยการนำ supernatant ที่ได้จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส มาวิเคราะห์ โดยการฉีดเข้าเครื่อง HPLC ที่ต่อกับเครื่อง fluorescence detector (Waters model 474) (รูปที่ 15) ตามวิธีของ Lindorth และ Mopper (1979)

ขั้นตอนในการวิเคราะห์เริ่มจากการนำตัวอย่าง supernatant ออกจากตู้แช่แข็ง ณ อุณหภูมิ -80°C มาตั้งไว้รอให้ละลายที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 1 นาที จากนั้นใช้ autopipette ดูด supernatant ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงใน reaction tube แล้วเติม derivatizing agent ที่มีส่วนผสมของ OPA และ β -mercaptoethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จับเวลา 2 นาที จากนั้นจึงใช้ microsyringe (Hamilton, Reno, NV, USA) ฉีดส่วนผสม 25 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC ผ่านทาง manual injector (model 7725, Rheodyne, Shimadzu,

Japan) เข้าสู่ HPLC column ที่มี Spherisorb[®] 5 μ m ODS2 particle (Waters Corp., Massachusetts, USA) เป็น stationary phase ในกระบวนการแยกสารนี้ใช้ gradient run ของ mobile phase ที่เป็นสารละลายของส่วนผสมของสารละลาย A (methanol) (HPLC grade, Lab-Scan Analytical Sciences, Lab-Scan Asia Co., Ltd., Thailand) และสารละลาย B ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ (buffer) ที่ประกอบด้วย Na_2HPO_4 (Riedel-de Haën, Germany) 0.038 โมลาร์และ NaH_2PO_4 (Riedel-de Haën, Germany) 0.012 โมลาร์ ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4 ± 0.2 โปรแกรม CLASS-VP Software ทำหน้าที่ควบคุม system controller (model SCL-10 AVP, Shimadzu, Japan) ในการกำหนดสัดส่วนของสารละลาย B และ A ตามช่วงระยะเวลาต่างๆ ดังนี้ 1) ช่วงเวลา 0 – 7 นาที เป็น 80% : 20% 2) ช่วงเวลา 7 - 22 นาที เป็น 70% : 30% 3) ช่วงเวลา 22 - 32 นาที เป็น 60% : 40% 4) ช่วงเวลา 32 - 35 นาที เป็น 80% : 40% และ 4) ช่วงเวลาจาก 35 นาทีจนถึงระบบกลับเข้าสู่สภาวะคงที่ เป็น 80% : 20% mobile phase นี้จะ flow เข้าสู่เครื่อง HPLC ด้วย solvent delivery module (LC-10AD vp, Shimadzu, Japan) ด้วยระบบปั๊มแบบ dual piston pump โดยมีเครื่อง degasser (DGU-14A, Shimadzu, Japan) ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศออกจาก mobile phase ก่อนเข้าสู่ HPLC column ที่ติดตั้งอยู่ใน column oven (CTO-AS vp, Shimadzu, Japan) โดยกำหนดอัตราการไหล (flow rate) ไว้ที่ 1 มล./นาที สารอนุพันธ์กรดอะมิโนที่ผ่านการแยกด้วย HPLC column นี้จะถูกส่งต่อไปที่เครื่อง scanning fluorescent detector (Waters[™] 474, MA, USA) โดยกำหนดค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้น (excitation wavelength) ไว้ที่ 330 นาโนเมตรและการปลดปล่อยพลังงาน (emission wavelength) ไว้ที่ 418 นาโนเมตร

สำหรับวิเคราะห์หาระดับสารสื่อประสาทชนิดซีโรโโทนินและโดปามีนมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ เริ่มจากการนำตัวอย่าง supernatant ออกจากตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C มาตั้งไว้รอให้ละลายที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 1 นาที จากนั้นใช้ microsyringe ดูด supernatant ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ที่มี mobile phase (ประกอบด้วย 0.02 M sodium acetate, 16 % v/v methanol (HPLC grade), 0.055 % w/v sodium 1-heptanesulfonate monohydrate, 0.2 mM EDTA disodium salt, 0.01% v/v dibutylamine) ปรับ pH ให้เป็น 3.92 ด้วย o-phosphoric acid ตั้งค่าอัตราการไหล (flow rate) ที่ 1 มล./นาที column ที่ใช้เป็นชนิด reversed-phase analytical column (Luna 5 μ m, 250 x 4.6-mm i.d.; Phenomenex) ตั้งอุณหภูมิของ column oven ที่ 30 องศาเซลเซียส และกำหนดความยาวคลื่นของเครื่อง scanning fluorescent detector (Waters[™] 474, MA, USA) คือความยาวคลื่นของการกระตุ้น (excitation wavelength) 280 นาโนเมตรและการปลดปล่อยพลังงาน (emission wavelength) 315 นาโนเมตร

ระดับการเรืองแสงของสารอนุพันธ์กรดอะมิโนหรือซีโรโโทนินที่วัดได้ แสดงถึงปริมาณของสารสื่อประสาทที่มีอยู่ในตัวอย่าง supernatant ซึ่งจะใช้ซอฟต์แวร์ HPLC workstation (Class-VP,

Shimadzu, Japan) ที่ติดตั้งไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ (Hewlett Packard, USA) ทำการประมวลผลกราฟโครมาโตแกรม



รูปที่ 15 เครื่องมือ HPLC และ fluorescence detector ที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนและซีโรโทนินในสมองในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

การทำ Standard calibration curve

การวิเคราะห์หาระดับกรดอะมิโนหรือซีโรโทนินจากตัวอย่าง supernatant โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม (area under the curve, AUC) ทำโดยการฉีดสารมาตรฐานกรดอะมิโน ได้แก่ แอสปาทเตต (D-aspartic acid, Fluka, Japan) กลูตาเมต (D-glutamic acid, Fluka, Japan) เซอรีน (D-serine, Sigma-Aldrich, Co., Japan) กลูตามีน (glutamine, Fluka, Japan) ไกลซีน (Glycine, Sigma, Steinheim, Germany) และกาบา (γ -aminobutyric acid, Sigma, Steinheim, Germany) โดยผสมกับ homoserine (L-Homoserine, Sigma Chemical Co., USA) ซึ่งใช้เป็น internal standard

ในส่วนการวิเคราะห์ซีโรโทนินและโดปามีนใช้สารมาตรฐานที่สั่งซื้อจาก Sigma-Aldrich, Co., Japan คือ นอร์อิพิเนฟริน (Nor-epinephrine), อิพิเนฟริน (Epinephrine), โดปามีน (Dopamine, 3-hydroxytyramine), ซีโรโทนิน (Serotonin, 5-hydroxytryptamine), โฮโมวานิลลิกแอซิด (Homovanillic acid, 4-hydroxy-3-methoxyphenyl acetic acid), โดแพค (DOPAC, 3,4-

dihydroxyphenyl acetic acid) ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นหนึ่งของสารมาตรฐาน ได้ทำการฉีด 3 ครั้ง และวัดพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรม แล้วนำมา plot กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น เพื่อสร้างกราฟ standard calibration curve ซึ่งเป็นกราฟเส้นตรงและได้สมการของเส้นกราฟ จากกราฟสามารถคำนวณกลับเพื่อหาระดับสารสื่อประสาทในตัวอย่าง supernatant ได้และนำ sample มาวิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนโดยใช้ BCA protein assay reagent kit และแสดงผลเปรียบเทียบระดับของสารสื่อประสาทต่อมิลลิกรัมโปรตีนเนื้อสมอง

การวัดค่าระดับน้ำตาลในเลือด

เนื่องจากในผลกล้วยสุกมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตถึง 22 % และมีน้ำตาลธรรมชาติ 3 ชนิด คือ ซูโครส ฟรุคโทส และ กลูโคส ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจในผลการบริโภคกล้วยระยะเวลานานต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลในเลือด ดังนั้นหลังจากที่เสร็จสิ้นการทดสอบพฤติกรรมต่างๆ หนูทดลองชุดที่หนึ่งทุกกลุ่มจะถูก terminate เพื่อแยกส่วนของสมองมาทำการวัดระดับทางชีวเคมีตามที่ได้กล่าวไปแล้วนั้น รวมทั้งวัดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแต่ละกลุ่มด้วยเครื่องวัดระดับน้ำตาล (Blood glucose meter) ยี่ห้อ ACCU-Check Performa (Roche, USA) หนูทดลองชุดที่สองไม่ได้ทำการวัด เนื่องจากพบว่าผลการตรวจระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแต่ละกลุ่มในหนูชุดที่หนึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและ strip ของเครื่องวัดน้ำตาลมีจำกัด

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะแสดงค่า mean $\pm$ S.E.M. (standard error of the mean) และนำมาทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วย Student's t-test หรือ one-way repeated measures ANOVA ตามความเหมาะสม และเมื่อผลของ ANOVA แสดงให้เห็นว่ามีข้อมูลบางชุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จะทำการทดสอบต่อด้วย Dunnett's post hoc test โดยถ้า $p < 0.05$ จะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

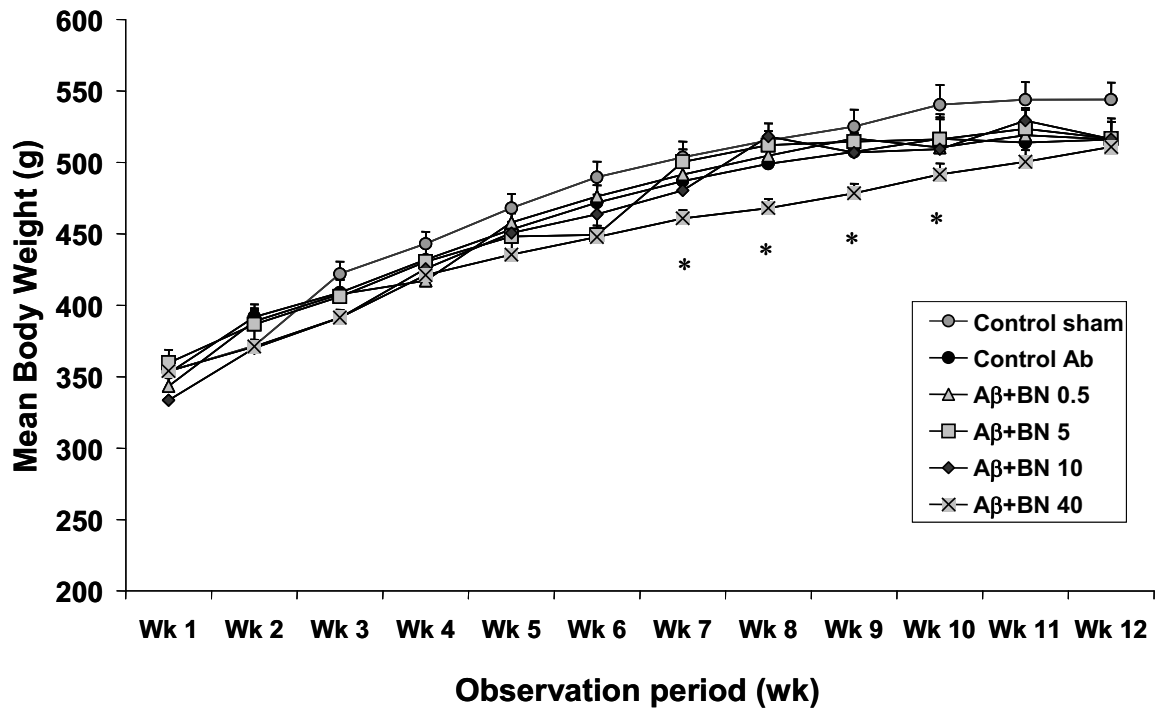
ผลการวิจัย

น้ำหนักหนูทดลอง

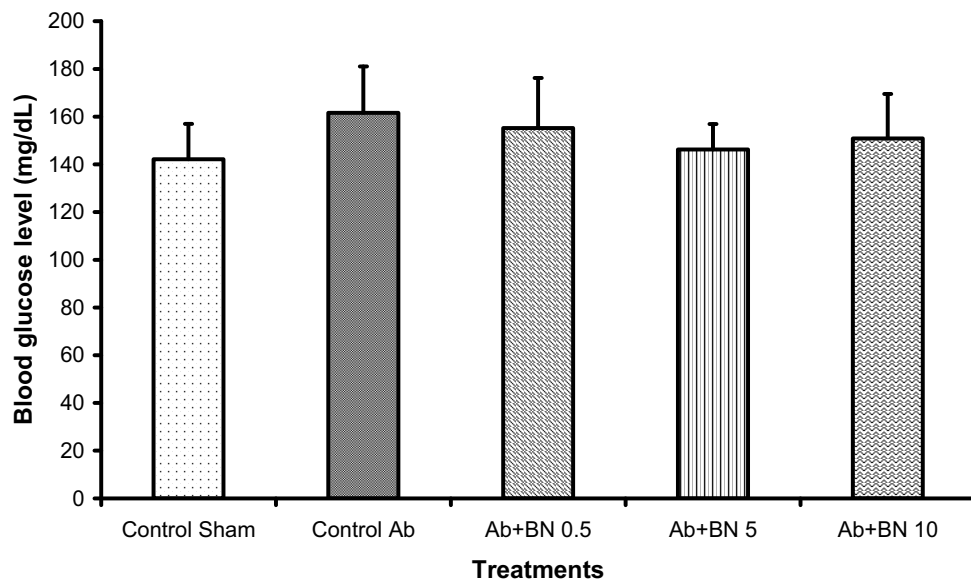
หนูทดลองในแต่ละกลุ่มมีน้ำหนักตัวเริ่มต้นเมื่อส่งจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติประมาณ 300 กรัม หลังจากได้รับหนูจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ปล่อยให้หนูทำความคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่เป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้ว ได้ทำการป้อนกล้วยบดหรือน้ำติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และได้ทำการชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวทุกสัปดาห์ พบว่าหลังจากที่เริ่มป้อนน้ำหรือกล้วยบดในสัปดาห์แรกจะมีน้ำหนักแตกต่างกันเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่หนูทดลองกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (Control Sham) มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 353.76 ± 7.99 กรัม และหนูทดลองกลุ่มควบคุมที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (Control AB) มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 352.68 ± 9.53 กรัม กลุ่มที่ได้รับกล้วยบดขนาด 0.5 ก./กก. และถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (AB+BN 0.5) มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 343.31 ± 12.17 กรัม, กลุ่มที่ได้รับกล้วยบดขนาด 5 ก./กก. และถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (AB+BN 5), มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเท่ากับ 368.10 ± 13.72 กรัม และกลุ่มที่ได้รับกล้วยบดขนาด 10 ก./กก. และถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (AB+BN 10) มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 333.29 ± 11.16 กรัม และกลุ่มที่ได้รับกล้วยบดขนาด 40 ก./กก. และถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (AB+BN 40) มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 354.0 ± 4.6 กรัม ข้อมูลน้ำหนักเฉลี่ยของหนูทดลองแต่ละกลุ่มแสดงดังกราฟ รูปที่ 16 ซึ่งจากกราฟพบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักหนูกลุ่ม control sham มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ และหนูที่ได้กล้วยบดขนาดสูงสุดคือ 40 ก./กก. น้ำหนักตัว มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักน้อยกว่าหนูในกลุ่มควบคุมปกติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 จนถึงสัปดาห์ที่ 10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ระดับน้ำตาลในเลือดหนูทดลอง

จากการวัดค่าระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากเสร็จสิ้นการทดลองโดยใช้ เครื่องวัดน้ำตาลในเลือด AccuChek Performa® ค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันมาก แสดงดังกราฟรูปที่ 17 โดยที่หนูกลุ่ม Control Sham มีค่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยเท่ากับ 142.14 ± 14.79 มิลลิกรัม/เดซิลิตร และหนูกลุ่ม Control AB มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 161.63 ± 19.49 กลุ่ม AB+BN0.5 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 155.25 ± 20.98 , กลุ่ม AB+BN5 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 146.25 ± 10.67 และกลุ่ม AB+BN10 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 150.88 ± 18.61 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ตามลำดับ (สำหรับการทดลองนี้ไม่มีผลการวัดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูกลุ่ม AB+BN40 ดังคำอธิบายในวิธีการทดลองหน้า 35)



รูปที่ 16 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของหนูทดลองในแต่ละกลุ่มตลอดระยะเวลาการวิจัย กลุ่ม Control Sham (n = 12), กลุ่ม Control AB (n = 12), กลุ่ม Aβ+BN 0.5 (n = 12), กลุ่ม Aβ+BN 5 (n = 12), กลุ่ม Aβ+BN 10 (n = 12), และกลุ่ม Aβ+BN 40 (n = 12) ค่าน้ำหนักของหนูในแต่ละกลุ่มถูกแสดงในรูปของ mean ± S.E.M (* = p < 0.05; unpaired t-test เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)



รูปที่ 17 แสดงค่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองในแต่ละกลุ่มในรูปของ mean ± S.E.M (Ab = Aβ)

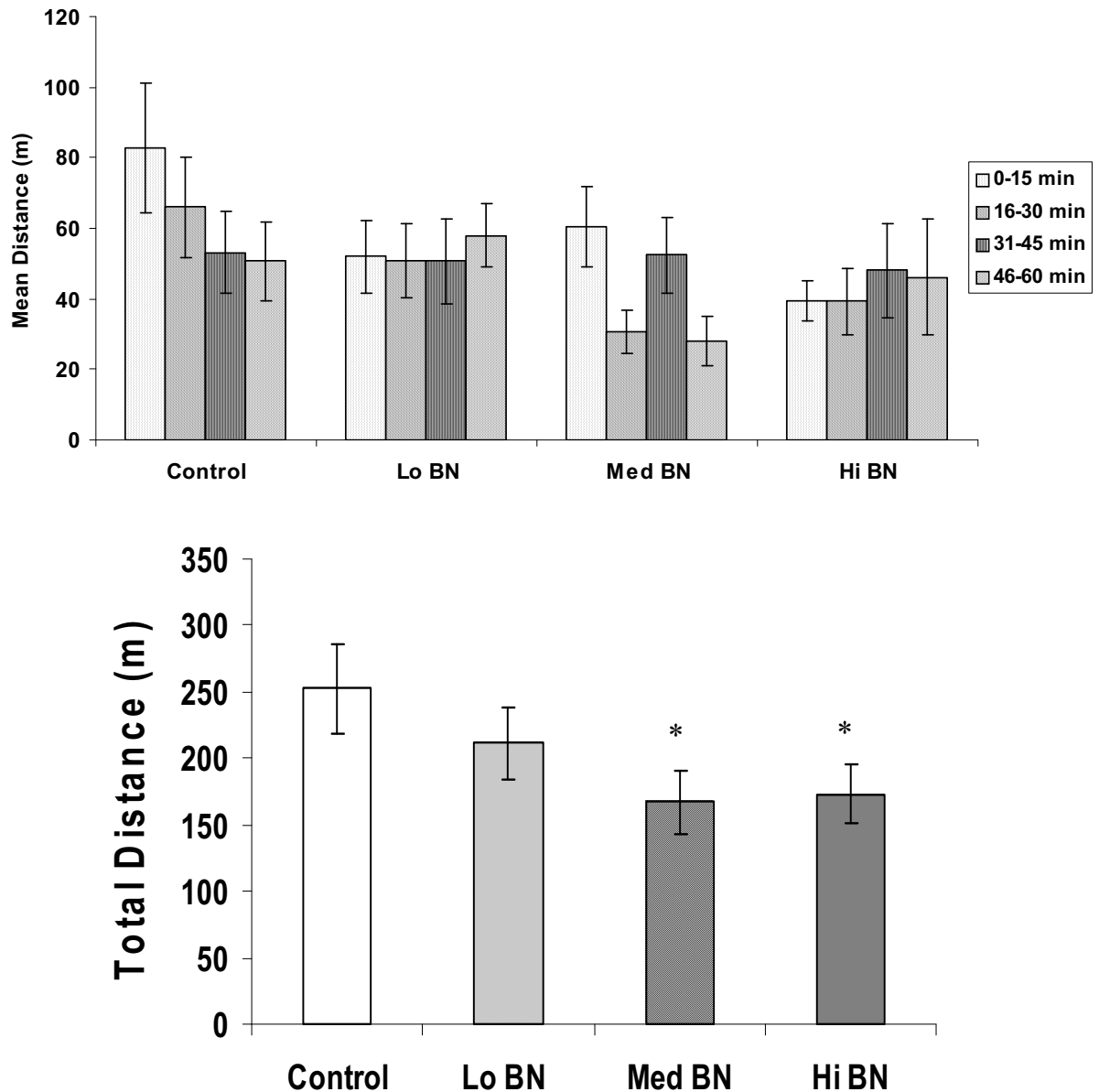
ผลของการทดสอบพฤติกรรมในสัตว์ทดลอง

ในการทดลองนี้ได้เน้นศึกษาฤทธิ์ของกล้วยต่อ 1) พฤติกรรมการเคลื่อนไหว 2) ฤทธิ์ในการต้านความกังวลและ 3) ความสามารถในการเรียนรู้และความจำซึ่งใช้วิธี Novel object recognition และ Morris Water Maze ดังนี้

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ของกล้วยต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหวในหนูทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าหลังจากป้อนน้ำหรือ กล้วยขนาด ที่ขนาด 0.5, 5, และ 10 ก./กก. น้ำหนักตัว หนูทดลองมีค่าเฉลี่ยระยะทางในการเคลื่อนไหว (mean distance) ในแต่ละช่วง 15 นาที (4 ช่วงเวลา) แสดงดังรูปที่ 18 (กราฟบน) จากรูปจะเห็นว่าหนูที่ได้รับน้ำจะมีค่าเฉลี่ยระยะทางที่เคลื่อนไหวลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ส่วนหนูที่ถูกป้อนกล้วยขนาด 0.5 ก./กก. มีค่าเฉลี่ยของระยะทางเคลื่อนไหวพอๆ กันตลอด 4 ช่วงเวลา

และหนูที่ถูกป้อนกล้วยขนาด 5 ก./กก. จะเคลื่อนไหวมากช่วง 15 นาทีแรกและระหว่างนาทีที่ 31-45 และหนูที่ถูกป้อนกล้วยขนาด 10 ก./กก. จะเคลื่อนไหวพอๆ กันตลอดระยะเวลาทุก 15 นาทีที่จับเวลา และหากคิดคำนวณระยะทางในการเคลื่อนไหวโดยรวมทั้งหมด 1 ชั่วโมงของหนูแต่ละกลุ่ม (รูปที่ 18 กราฟล่าง) พบว่าการได้รับกล้วยในขนาด 0.5 (Lo BN), 5 (Med BN) และ 10 (Hi BN) ก./กก. น้ำหนักตัว ส่งผลทำให้หนูมีการเคลื่อนไหวลดลง คือ มีค่าเท่ากับ 211.2 ± 27.1 , 166.8 ± 23.4 , 172.9 ± 22.2 เมตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำมีค่าระยะทางในการเคลื่อนไหวโดยรวมทั้งหมด 1 ชั่วโมงเท่ากับ 252.6 ± 34 เมตร เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ถูกป้อนกล้วยในขนาด 5 และ 10 ก./กก. เท่านั้นที่มีระยะทางในการเคลื่อนไหวโดยรวมต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* = $p < 0.05$; unpaired t-test)



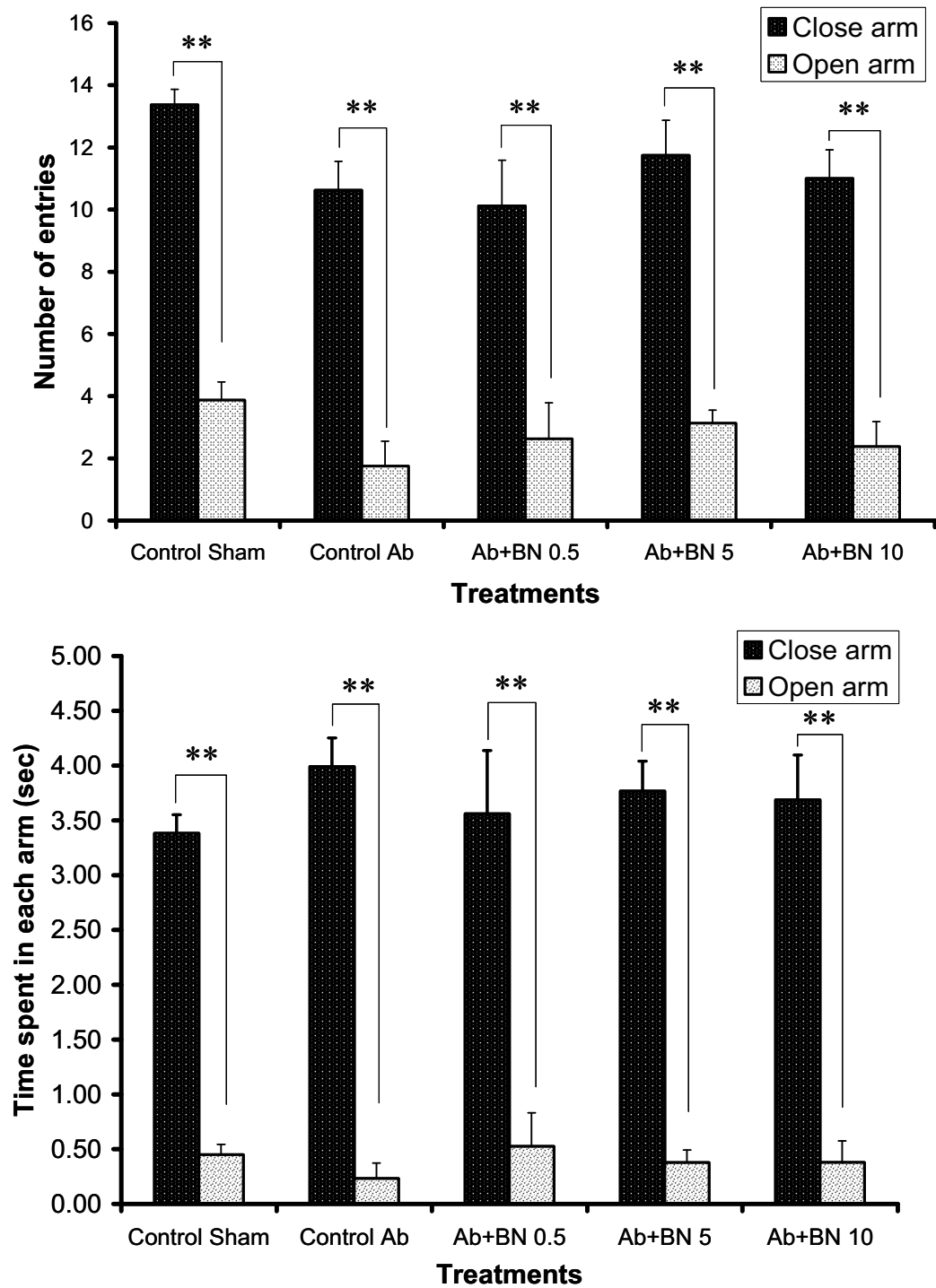
รูปที่ 18 ผลของการได้รับกล้วยในขนาด 0.5 (Lo BN), 5 (Med BN) และ 10 (Hi BN) ก./กก. น้ำหนักตัว โดยเฉลี่ยในแต่ละช่วง 15 นาที (4 ช่วงเวลา) (กราฟบน) และเมื่อคิดเป็นผลรวมระยะทางทั้งหมดที่หนูเคลื่อนไหวใน 1 ชั่วโมง (กราฟล่าง) เปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม ซึ่งพบว่าหนูทดลองที่ถูกป้อนกล้วยในขนาด 5 และ 10 ก./กก. จะมีระยะทางในการเคลื่อนไหวโดยรวมต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* = $p < 0.05$; unpaired t-test)

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ของกล้วยในด้านความกังวลในหนูทดลอง

ผลจากการทดสอบด้วยวิธี Elevated plus maze Test แสดงดังรูปที่ 19 (กราฟบน) ซึ่งพบว่า ก่อนทำการผ่าตัด หนูทุกกลุ่มแสดงพฤติกรรมสำรวจเหมือนหนูปกติทั่วไปคือจะเดินเข้าไปยังแขนที่มีผนังกัน (close arm) มากกว่าแขนที่ไม่มีผนังกัน (open arm) ค่าเฉลี่ยของการเข้าแขน close arm และ open arm ภายในเวลา 5 นาที ของหนูกลุ่ม control sham มีค่าเท่ากับ 13.375 ± 0.492 และ 3.875 ± 0.587 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของการเข้าแขน close arm และ open arm ของหนูกลุ่ม control A β มีค่าเท่ากับ 10.625 ± 0.924 และ 1.75 ± 0.802 ตามลำดับ และจากผลจากกลุ่มหนูที่ได้รับกล้วย ทั้ง 3 ขนาดไม่พบว่ามีค่าแตกต่างระหว่างกลุ่มกันแต่อย่างใด จากผลค่าเฉลี่ยระยะเวลาที่หนูใช้อยู่ในแขนแต่ละแขน (รูปที่ 19 กราฟล่าง) พบว่าหนูทุกกลุ่มใช้เวลาส่วนใหญ่อยู่ในแขน close arm มากกว่า open arm และไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ซึ่งเป็นไปตามธรรมชาติของหนูปกติทั่วไป ที่จะรู้สึกหวาดกลัว กังวล เมื่อมันเดินบนแขนที่ไม่มีผนังกัน และเลือกที่จะไม่เข้าไปในแขนที่ไม่มีผนังกันทั้งสองแขน

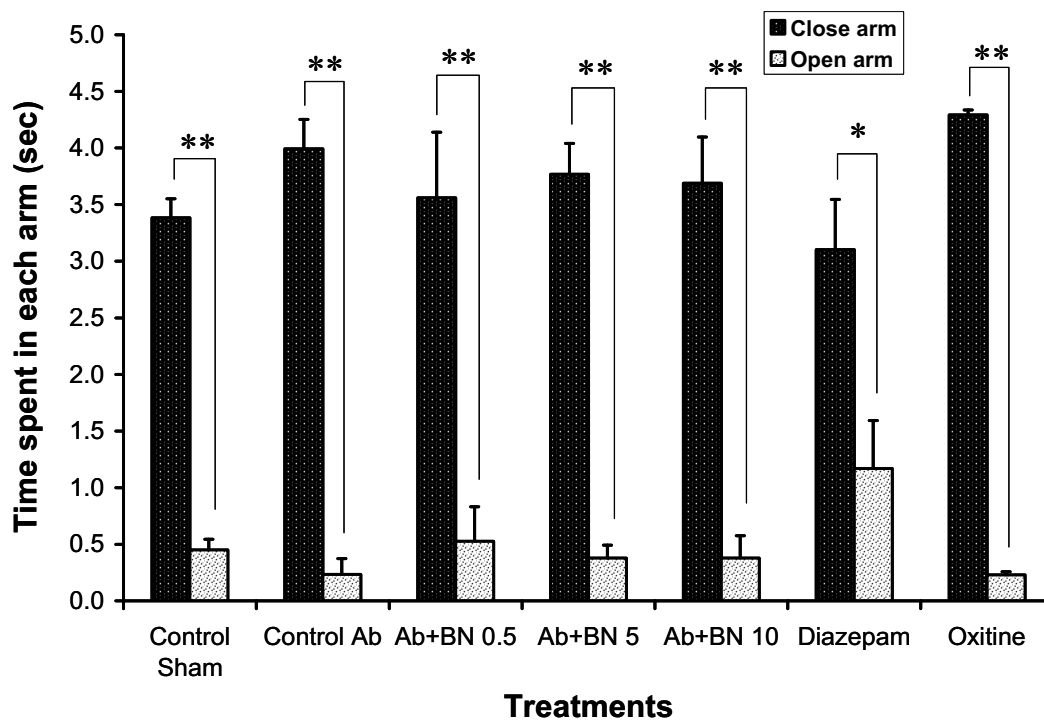
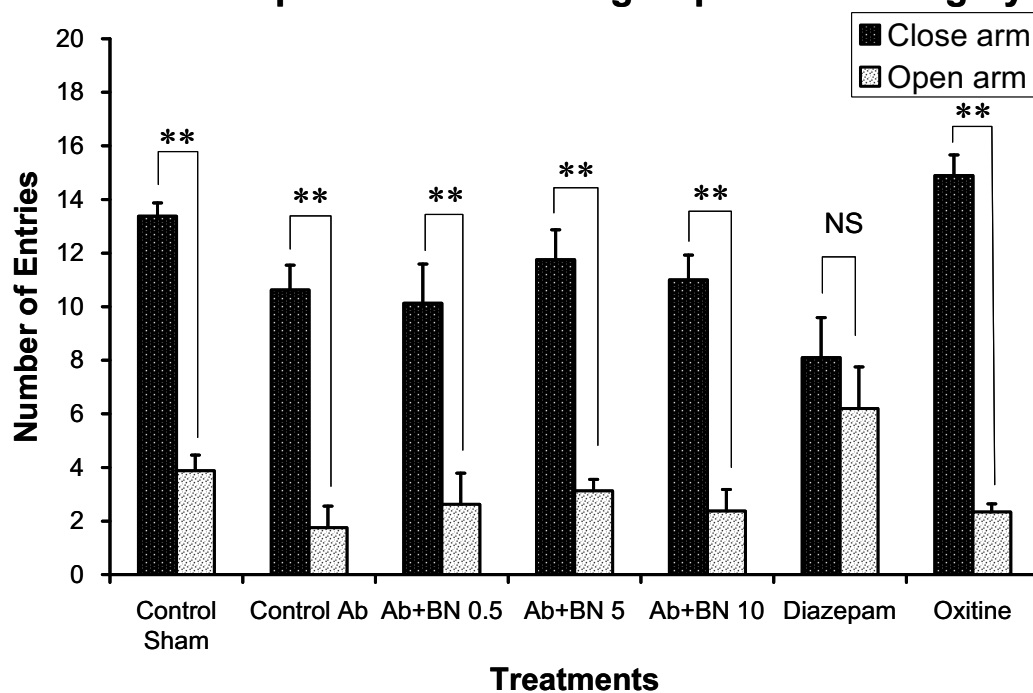
ในการทดสอบภายหลังจากการผ่าตัดได้กระทำในหนูทดลองปกติเพิ่มขึ้นอีก 2 กลุ่ม โดยหนูเหล่านี้จะได้รับยา diazepam ซึ่งนิยมใช้ในการคลายความวิตกกังวล (anti-anxiety) ขนาด 2 มก/กก น้ำหนักตัว หรือ ยา fluoxetine (Oxetine) ซึ่งเป็นที่นิยมใช้รักษาอาการของโรคซึมเศร้า (depression) ขนาด 10 มก/กก น้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการทดสอบพฤติกรรม เพื่อยืนยันผลการทดลองว่าหากหนูคลายความกังวลแล้วหนูจะเดินเข้าหรือใช้เวลาในแขนที่ไม่มีผนังกัน (open arm) มากขึ้นกว่าปกติ ซึ่งจากผลการทดลอง (รูปที่ 20) พบว่า หนูทุกกลุ่ม (กลุ่ม control sham, control A β , A β +BN 0.5, A β +BN 5, A β +BN 10) แสดงผลพฤติกรรมไม่แตกต่างจากผลก่อนผ่าตัดกล่าวคือหนูทุกกลุ่มยังคงแสดงพฤติกรรมที่เป็นปกติคือมีจำนวนครั้งและระยะเวลาของการเข้าไปในแขนที่มีผนังกัน (close arm) มากกว่าแขนเปิดที่ไม่มีผนังกัน (open arm) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนหนูปกติที่ได้รับยาคลายกังวล หรือ diazepam มีจำนวนครั้งของการเข้าแขนที่ไม่มีผนังกัน (open arm) มากขึ้นใกล้เคียงกับจำนวนการเข้าแขนที่มีผนังกัน (close arm) (รูปที่ 20 กราฟบน) อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่หนูใช้อยู่ในแขน open arm มากขึ้นแต่ยังคงน้อยกว่าระยะเวลาที่อยู่ในแขน close arm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 20 กราฟล่าง) ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับยาแก้โรคซึมเศร้า Oxetine ยังคงแสดงพฤติกรรมเหมือนหนูปกติทั่วไปคือ จำนวนครั้งและระยะเวลาของการเข้าแขนที่มีผนังกัน (close arm) มากกว่าแขนที่ไม่มีผนังกัน (open arm)

Elevated plus maze of each group before the surgery



รูปที่ 19 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งที่หนูแต่ละกลุ่มเข้าแขน close arm และ open arm (กราฟบน) และ ค่าเฉลี่ยของเวลารวมทั้งหมดที่หนูแต่ละกลุ่มใช้ในการเข้าแขน close arm และ open arm (กราฟล่าง) เมื่อทำการทดสอบก่อนผ่าตัด (** = $p < 0.01$; unpaired t-test)

Elevated plus maze of each group after the surgery



รูปที่ 20 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งที่หนูแต่ละกลุ่มเข้าแขน close arm และ open arm (กราฟบน) และ ค่าเฉลี่ยของเวลารวมทั้งหมดที่หนูแต่ละกลุ่มใช้ในการเข้าแขน close arm และ open arm (กราฟล่าง) เมื่อทำการทดสอบหลังผ่าตัด (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$; unpaired t-test)

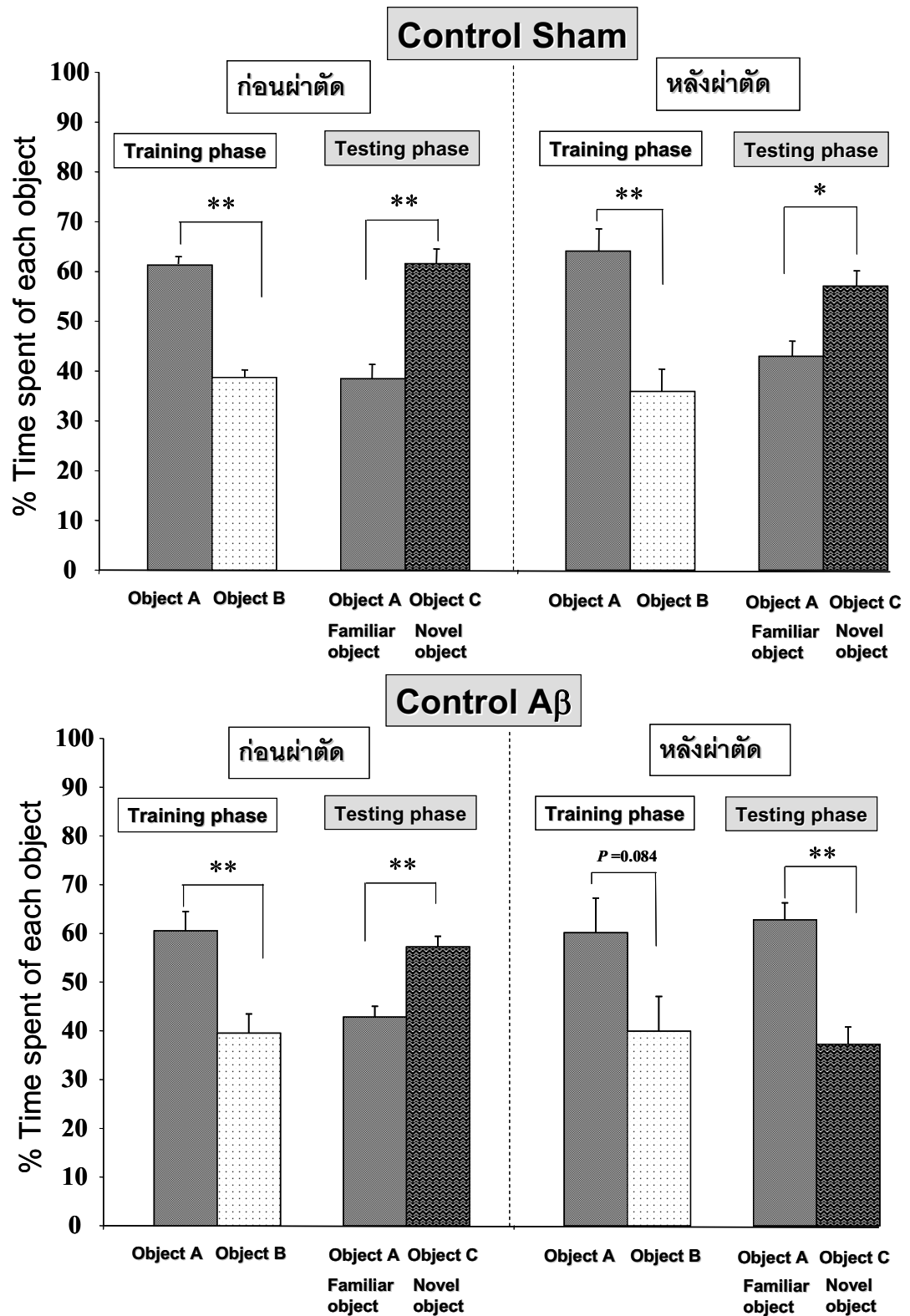
3. ผลการทดสอบฤทธิ์ของกล้วยในการเรียนรู้และความจำ

3.1 ผลการทดสอบโดยใช้ Novel Object Recognition (NOR) Test

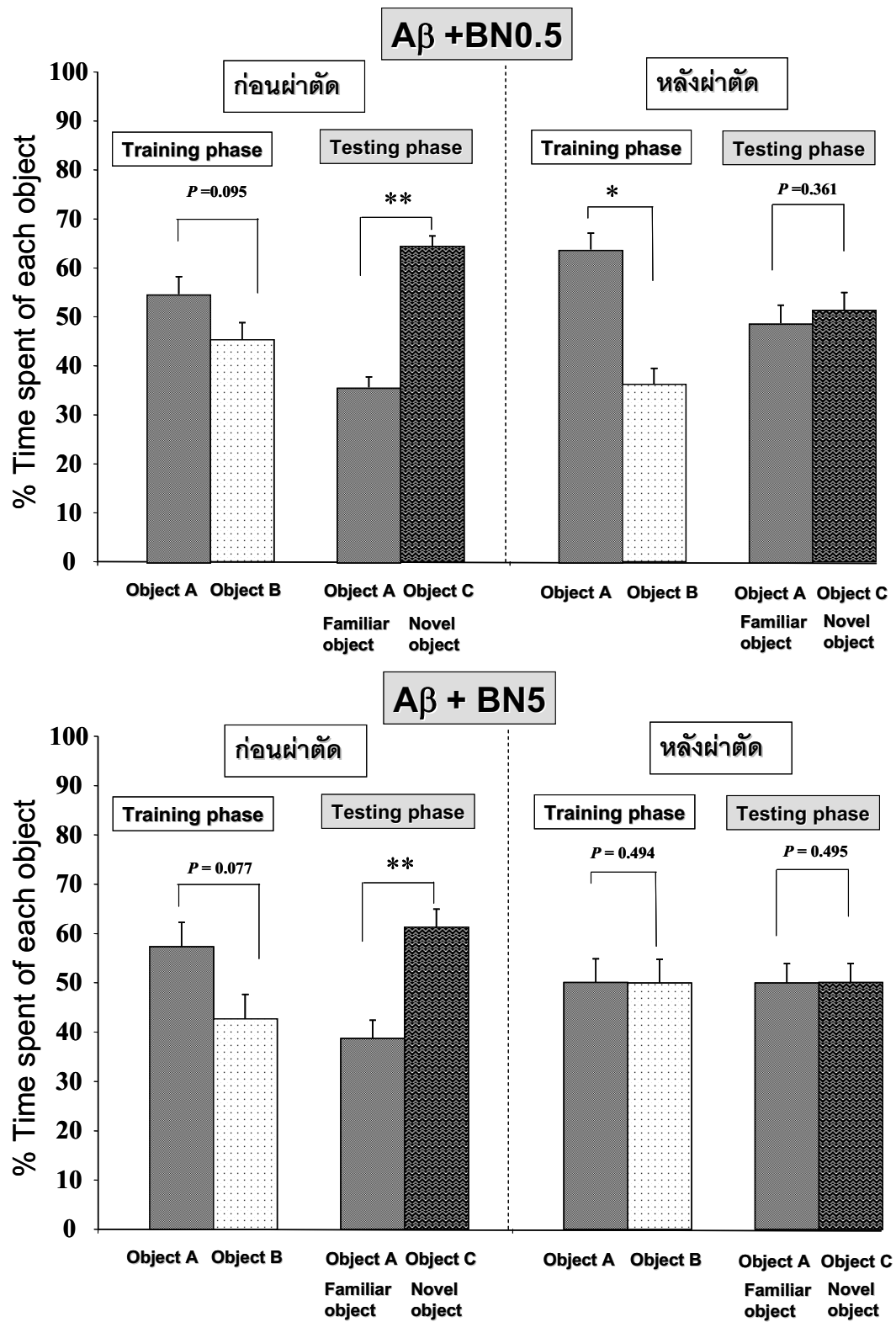
เป็นการทดสอบความคุ้นเคยต่อวัตถุที่เคยเห็นหรือสัมผัสก่อนหน้านี้ในเวลาผ่านไปเพียงไม่กี่นาทีก่อนว่าสามารถจำได้หรือไม่ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเวลาที่หนูแต่ละกลุ่มก่อนและหลังการผ่าตัดเพื่อฉีดตัวทำละลายหรือฉีด amyloid β peptides และ 10 วันหลังทำการผ่าตัด ของหนูแต่ละกลุ่มแสดงดังรูปที่ 21, 22 และ 23 โดยที่หนูในกลุ่ม control sham (รูปที่ 21 กราฟบน) มีผลความสามารถในการจดจำวัตถุที่เป็นปกติ คือสามารถจดจำได้ว่าวัตถุ A ซึ่งเป็นวัตถุที่เคยสำรวจมาแล้ว (familiar object) ในช่วง training phase จึงใช้เวลาในการสำรวจวัตถุ C (novel object) ในช่วง testing phase มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$; paired t-test) ผลที่ได้นี้ไม่แตกต่างเมื่อทำการทดสอบก่อนและหลังผ่าตัด ในทางตรงกันข้าม หนูในกลุ่ม control A β (รูปที่ 21 กราฟล่าง) มีผลความสามารถในการจดจำวัตถุที่เป็นปกติในช่วงก่อนการผ่าตัด จึงใช้เวลาในการสำรวจวัตถุ C ในช่วง testing phase มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$; paired t-test) หลังการผ่าตัดเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องด้วย A β peptides พบว่าหนูไม่สามารถแยกแยะได้ว่าวัตถุใดเป็นวัตถุที่เคยสำรวจมาแล้ว ในช่วง training phase จึงยังคงใช้เวลาในการสำรวจวัตถุ A ซึ่งเป็นวัตถุที่เคยสำรวจมาแล้วมากกว่าวัตถุ C ในช่วง testing phase อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$; paired t-test)

สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนกล้วยขนาด 0.5 ก./กก. (A β +BN0.5) และ 5 ก./กก. (A β +BN5) พบว่า ก่อนผ่าตัดมีความสามารถในการจดจำวัตถุสิ่งของที่เป็นปกติดี ดังแสดงในรูปที่ 22 กราฟบน และกราฟล่างตามลำดับ หลังการผ่าตัดเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องด้วย A β peptides ซึ่งแม้ว่าหนูไม่สามารถแยกแยะได้ว่าวัตถุใดเป็นวัตถุที่เคยสำรวจมาแล้วในช่วง training phase โดยใช้เวลาในการสำรวจวัตถุ A (familiar object) ไม่แตกต่างจากเวลาที่ใช้ในการสำรวจวัตถุ C (novel object) ในช่วง testing phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.361$ และ $P = 0.495$ ตามลำดับ) แต่ยังไม่มีความจำบกพร่องเทียบเท่ากับหนูกลุ่ม control A β (รูปที่ 21 กราฟล่าง)

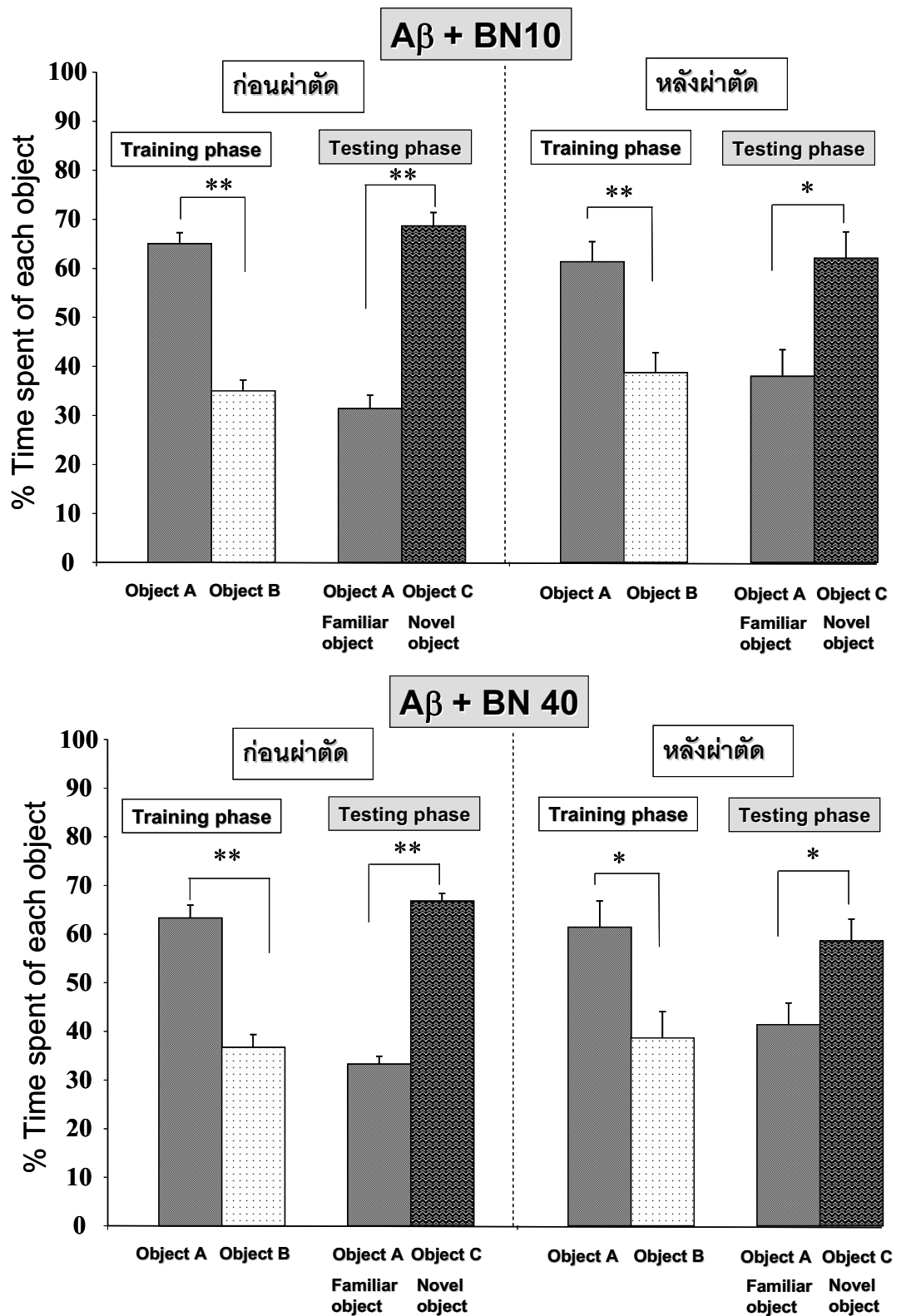
ส่วนหนูในกลุ่ม A β +BN10 (รูปที่ 23 กราฟบน) และ กลุ่ม A β +BN40 (รูปที่ 23 กราฟล่าง) เมื่อทำการทดสอบหนูทุกกลุ่มก่อนการผ่าตัดเพื่อฉีดตัวทำละลายหรือ A β peptides เข้าไปในสมอง พบว่ามีผลความสามารถในการจดจำวัตถุเป็นปกติในช่วงก่อนการผ่าตัด จึงใช้เวลาในการสำรวจวัตถุ C หรือ novel object ในช่วง testing phase มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ หลังการผ่าตัดเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องด้วย A β peptides พบว่าหนูยังคงสามารถแยกแยะได้ว่าวัตถุใดเป็นวัตถุที่เคยสำรวจมาแล้วในช่วง training phase จึงทำให้ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุ A เป็นวัตถุที่เคยสำรวจมาแล้ว (familiar object) น้อยกว่าวัตถุ C หรือ novel object ในช่วง testing phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$; paired t-test) แสดงว่าการได้รับกล้วยขนาด 10 และ 40 ก./กก. น้ำหนัก ตัวสามารถป้องกันความจำบกพร่องได้



รูปที่ 21 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เวลาที่หนูกลุ่ม ควบคุม control sham (กราฟบน) และหนูกลุ่ม ความจำบกพร่อง control A β (กราฟล่าง) ใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นในช่วง training phase และ ช่วง testing phase (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$; paired t-test)



รูปที่ 22 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เวลาที่หนูกลุ่ม Aβ + BN0.5 (กราฟบน) และหนูกลุ่ม Aβ + BN5 (กราฟล่าง) ใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นในช่วง training phase และช่วง testing phase (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$; paired t-test)



รูปที่ 23 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เวลาที่หนูกลุ่ม Aβ+BN10 (กราฟบน) และหนูกลุ่ม Aβ+BN40 (กราฟล่าง) ใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นในช่วง training phase และช่วง testing phase (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$; paired t-test)

3.2 ผลการทดสอบโดยใช้ Morris Water Maze Test

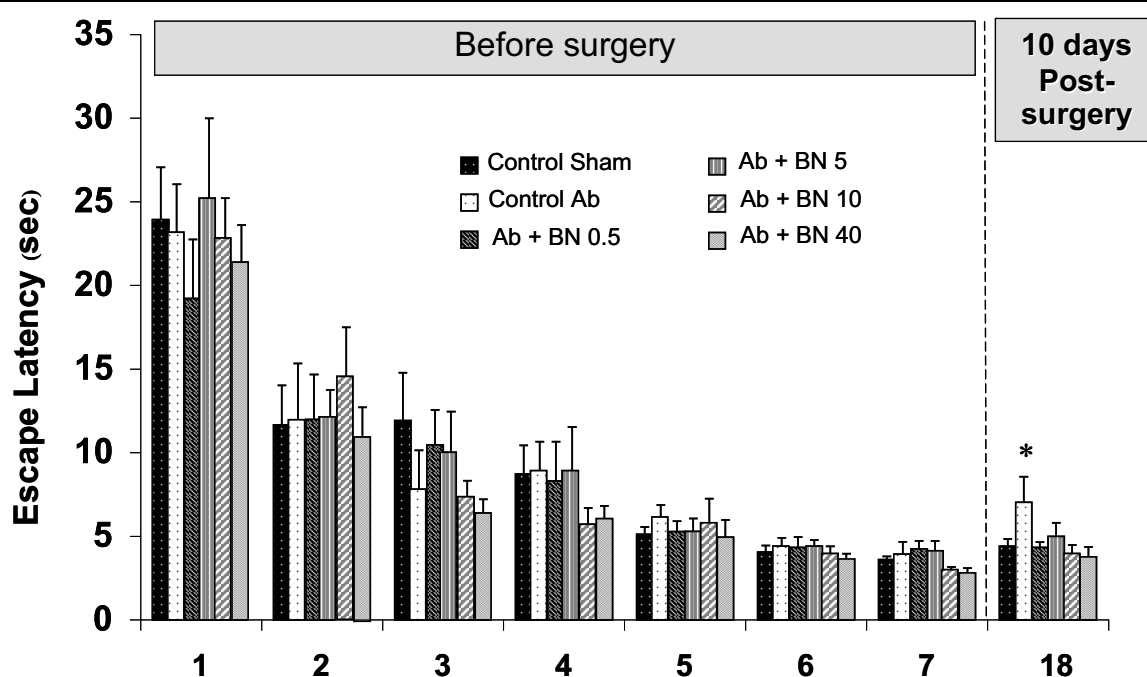
วิธีที่ใช้ศึกษา spatial reference memory พบว่าเวลาของหนูทุกกลุ่มที่ใช้ในการหาแท่นได้น้ำ (Escape latency) ตั้งแต่วันที่ 2 ของการฝึกจนถึงวันสุดท้ายของการฝึกมีค่าใกล้เคียงกันและลดลงเป็นลำดับเมื่อฝึกว่ายน้ำเป็นเวลา 7 วัน หลังจากทำการผ่าตัด 10 วันนำหนูทุกกลุ่มมาทดสอบอีกครั้ง พบว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่อง (control A β) ใช้ระยะเวลาในการหาแท่นได้น้ำมากกว่าหนูในกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 24) และเมื่อทำการทดสอบการดึงเอาความจำเก่ามาใช้ (retention memory) ด้วย Probe Trial Test โดยจะนำแท่นได้น้ำออกและจับเวลาที่หนูทดลองว่ายน้ำอยู่ในแต่ละ zone ของอ่างน้ำทรงกลมโดยคิดค่าเวลาที่หนูทดลองอยู่ในแต่ละ zone เป็นเปอร์เซ็นต์จากเวลาทั้งหมด 90 วินาทีที่ให้หนูทดลองว่ายน้ำ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 และ รูปที่ 25 พบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (Control Sham) มีค่าเฉลี่ยของเวลาที่ว่ายวนหาแท่นในแต่ละโซนไม่เท่ากันโดยจะว่ายวนอยู่ในโซนที่เคยมีแท่นมาก่อน (โซน 4) นานกว่าโซนอื่นคือ 35.72 ± 3.96 % แสดงว่าหนูกลุ่มนี้ยังมีความสามารถในการดึงความจำเก่าดีอยู่ จึงจำโซนที่เคยมีแท่นได้และพยายามว่ายวนหาแท่นในโซนนั้น ส่วนหนูทดลองกลุ่มควบคุมที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (Control A β) ใช้เวลาในการว่ายน้ำในแต่ละ zone ดังนี้ zone 1 คือ 17.14 ± 2.03 %, zone 2 คือ 20.46 ± 2.13 %, zone 3 คือ 31.88 ± 2.98 % และ zone 4 คือ 30.50 ± 2.67 % ซึ่งแสดงว่าหนูกลุ่มนี้จำไม่ได้ว่าโซนใดเป็นโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำมาก่อน

หนูทดลองกลุ่มที่ถูกการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องและได้รับกลัวยบดขนาด 0.5, 5 และ 10 ก/กน้ำหนักตัว (กลุ่ม A β +BN0.5, A β +BN5, และ A β +BN10 ตามลำดับ) ใช้เวลาว่ายวนอยู่ในโซนที่เคยมีแท่น (โซนที่ 4) น้อยกว่าหนูในกลุ่ม control sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* = $p < 0.05$, one way repeated ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test) แสดงว่าหนูจำไม่ได้ว่าโซนใดเคยมีแท่นอยู่

ในขณะที่หนูในกลุ่ม A β +BN40 ใช้เวลาว่ายวนอยู่ในโซนที่เคยมีแท่น (โซนที่ 4) มากกว่าโซนอื่นๆ และไม่แตกต่างจากค่าระยะเวลาที่ใช้ในหนูกลุ่ม control sham แสดงว่าหนูกลุ่มนี้ยังมีความสามารถในการดึงความจำเก่าดีอยู่ว่ายวนหาแท่นอยู่ในโซนที่เคยมีแท่นมาก่อนนานกว่าโซนอื่นๆ

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean $\pm$ SEM) ของเวลาที่หนูใช้ในการหาแท่นได้น้ำ (Escape latency) จากการปล่อยหนูในอ่างน้ำ 3 ตำแหน่งในช่วง ก่อนผ่าตัดสมองและหลังผ่าตัดสมอง

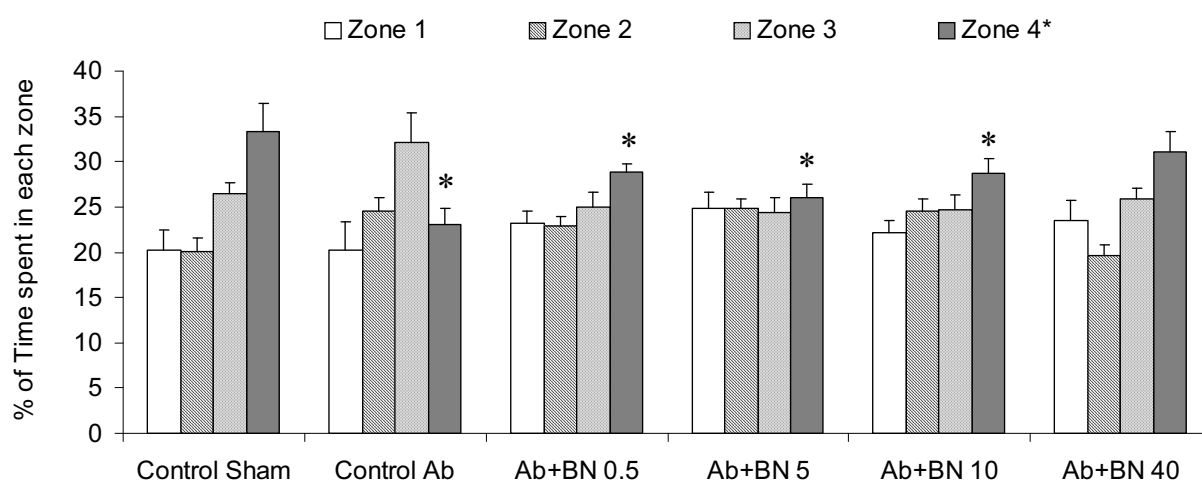
Groups	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	10 days post surgery
Control sham	23.94 ± 3.12	11.67 ± 2.35	11.91 ± 2.87	8.73 ± 1.71	5.12 ± 0.44	4.06 ± 0.39	3.61 ± 0.19	4.42 ± 0.41
Control A β	23.18 ± 2.87	11.97 ± 3.37	7.82 ± 2.33	8.94 ± 1.72	6.15 ± 0.73	4.42 ± 0.47	3.94 ± 0.72	7.03 $\pm 1.53^*$
A β + BN0.5	19.22 ± 3.52	12.00 ± 2.67	10.47 ± 2.08	8.31 ± 2.35	5.28 ± 0.63	4.33 ± 0.62	4.25 ± 0.48	4.33 ± 0.32
A β + BN5	25.22 ± 4.77	12.14 ± 1.61	10.03 ± 2.42	8.92 ± 2.62	5.31 ± 0.76	4.42 ± 0.37	4.14 ± 0.58	5.00 ± 0.81
A β + BN10	22.83 ± 2.39	14.53 ± 2.98	7.36 ± 0.97	5.72 ± 0.98	5.81 ± 1.45	3.97 ± 0.43	3.00 ± 0.17	3.97 ± 0.51
A β + BN40	21.39 ± 2.22	11.00 ± 1.72	6.39 ± 0.83	6.06 ± 0.77	4.94 ± 1.04	3.64 ± 0.32	2.81 ± 0.30	3.78 ± 0.58



รูปที่ 24 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยของเวลาที่หนูทดลองแต่ละกลุ่มใช้ในการหาแท่นได้น้ำ (Escape latency) ระหว่างการฝึกก่อนการผ่าตัดเป็นเวลา 7 วันติดต่อกันและทำการทดสอบอีกครั้งหลังผ่าตัดสมองไปแล้ว 10 วัน (* = $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control sham; repeated measures one-way ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ย (Mean $\pm$ SEM) ของระยะเวลาที่ใช้ในการว่ายน้ำหาแท่นในแต่ละ Zone หลังเอาแท่นออก ในช่วง probe trial test ของหนูในแต่ละกลุ่ม

Groups	zone 1	zone 2	zone 3	zone 4*
Control sham	20.23 $\pm$ 2.18%	20.10 $\pm$ 1.40%	26.41 $\pm$ 1.25%	33.26 $\pm$ 3.13%
Control A β	20.28 $\pm$ 3.06%	24.51 $\pm$ 1.44%	32.18 $\pm$ 3.24%	23.03 $\pm$ 1.78%
A β + BN0.5	23.16 $\pm$ 1.39%	22.91 $\pm$ 1.00%	25.03 $\pm$ 1.64%	28.91 $\pm$ 0.89%
A β + BN5	24.80 $\pm$ 1.76%	24.76 $\pm$ 1.17%	24.35 $\pm$ 1.73%	26.09 $\pm$ 1.45%
A β + BN10	22.09 $\pm$ 1.35%	24.48 $\pm$ 1.46%	24.68 $\pm$ 1.71%	28.75 $\pm$ 1.61%
A β + BN40	23.49 $\pm$ 2.30%	19.57 $\pm$ 1.29%	25.83 $\pm$ 1.21%	31.11 $\pm$ 2.16%



รูปที่ 25 แสดงค่าเฉลี่ยของหนูแต่ละกลุ่มที่ใช้ในการว่ายน้ำอยู่ในแต่ละ zone ของอ่างน้ำ ภายหลังจากที่มีการนำแท่นได้น้ำออก (probe trial) ซึ่งทำการทดสอบ 12 วันหลังการผ่าตัด โดย Zone 4* คือ zone ที่เคยมีแท่นได้น้ำในช่วงที่มีการฝึกให้หนูทดลองหาแท่นได้น้ำ จากผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่ม Ab+BN 40 เท่านั้นที่สามารถจดจำโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำ โดยใช้เวลาในการว่ายน้ำในโซนที่ 4 ได้นานมากกว่ากลุ่มอื่น และไม่แตกต่างกับกลุ่ม control sham อย่างมีนัยสำคัญ (* = $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเวลาของหนูกลุ่ม Control Sham; one way repeated ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test)

5. ผลการทำ Standard calibration curve สำหรับการวัดสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโน

การวิเคราะห์สารมาตรฐานของกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา โดยใช้โฮโมเซอรีนเป็น internal standard ด้วยเครื่อง HPLC ร่วมกับเครื่อง fluorescence detector และใช้โปรแกรม Class-VP (Shimadzu Scientific Instruments, Japan) เพื่อวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC)

ในการเตรียมสารมาตรฐานได้คำนวณเป็นความเข้มข้น หน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ (mM) และได้คำนวณกลับเป็นหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตาราง 4 คำนวณน้ำหนักโมเลกุลและการคำนวณความเข้มข้นหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ (mM) และปริมาณเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) ของสารมาตรฐานกรดอะมิโนที่ 5 ความเข้มข้น

	concentration	0.025 mM	0.050 mM	0.125 mM	0.250 mM	0.500 mM
Standard	MW	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
Aspartate	133.11	3.50	7.00	17.50	35.00	70.00
Glutamate	147.13	3.67	7.33	18.33	36.67	73.33
Serine	105.09	2.83	5.67	14.17	28.33	56.67
Glutamine	146.15	3.83	7.67	19.17	38.33	76.67
Glycine	75.07	2.67	5.33	13.33	26.67	53.33
GABA	103.12	2.83	5.67	14.17	28.33	56.67

ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน 6 ชนิด ชนิดละ 5 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยของสารมาตรฐานต่างๆ แสดงดังตารางที่ 5 และตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานต่างๆ ความเข้มข้น 0.02, 0.05, 0.125, 0.25, และ 0.5 มิลลิโมลาร์ แสดงดังรูปที่ 26, 27 28, 29 และ 30 ตามลำดับ และเมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรมและปริมาณความเข้มข้นหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐานแอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา จะได้กราฟดังรูปที่ 31 32 และ 33 ตามลำดับ ข้อมูลนี้ใช้ในการคำนวณหาระดับกรดอะมิโนจากตัวอย่าง supernatant ของ สมอง ต่อไป

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบความแม่นยำของการฉีดสารมาตรฐานชนิดต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC และ fluorescence detector นี้ เพื่อหา intraday variation ด้วยการเตรียมสาร 3 ความเข้มข้นต่อชนิดของสารมาตรฐาน แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา ทำการฉีด 6 ครั้งภายในวันเดียวกัน คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง HPLC คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation , SD) และค่า % coefficients of variation (%CV) ข้อมูลที่ได้แสดงดังตารางที่ 6

ตาราง 5 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของกรดอะมิโน แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา 5 ความเข้มข้นหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเฉลี่ยที่ได้จากการฉีด 3 ครั้ง

Aspartate				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
3.50	582,489	591,851	609,810	594,717
7.00	1,177,263	1,073,284	1,104,069	1,118,205
17.50	3,018,231	2,956,524	3,000,139	2,991,631
35.00	5,411,950	5,039,178	5,575,224	5,342,117
70.00	10,240,378	9,996,989	11,165,377	10,467,581

Glutamate				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
3.67	564,584	604,973	604,029	591,195
7.33	1,243,140	1,227,711	1,188,840	1,219,897
18.33	2,845,374	2,733,587	2,544,745	2,707,902
36.67	5,287,021	5,105,304	5,371,255	5,254,527
73.33	10,208,899	9,851,666	10,921,887	10,327,484

Serine				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
2.83	477,575	469,378	483,206	476,720
5.67	1,094,930	1,031,534	1,028,826	1,051,763
14.17	2,162,947	2,200,949	2,083,776	2,149,224
28.33	4,288,870	4,184,739	4,239,633	4,237,747
56.67	7,982,842	7,929,683	9,078,621	8,330,382

Glutamine				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
3.83	586,324	566,769	574,592	575,895
7.67	1,280,017	1,169,044	1,174,654	1,207,905
19.17	2,880,441	2,790,697	2,761,089	2,810,742
38.33	5,708,374	5,485,879	5,916,320	5,703,524
76.67	11,278,242	10,840,357	11,980,609	11,366,403

Glycine				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
2.67	483,499	483,148	498,533	488,393
5.33	1,026,187	915,846	967,944	969,992
13.33	2,322,171	2,337,904	2,394,803	2,351,626
26.67	5,265,884	5,247,970	4,738,974	5,084,276
53.33	9,917,786	9,995,206	10,760,687	10,224,560

GABA				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
2.83	776,218	757,639	779,703	771,187
5.67	1,493,974	1,642,633	1,435,131	1,523,913
14.17	3,535,381	3,369,680	3,390,747	3,431,936
28.33	6,985,891	7,052,891	6,851,129	6,963,304
56.67	13,585,276	12,878,375	14,351,146	13,604,932

ตาราง 7 แสดง interday variation (ค่า mean, SD, % CV) ของสารมาตรฐานกรดอะมิโน แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา ของการวิเคราะห์ใน 6 วัน

Standard (Low conc)																	
	conc. (ug/ml)	Day 1	conc.(ug/ml)	Day 2	conc.(ug/ml)	Day 3	conc.(ug/ml)	Day 4	conc.(ug/ml)	Day 5	conc.(ug/ml)	Day 6	conc.(ug/ml)	mean peak area	conc.Mean	SD conc.	%CV
Aspartate	3.00	616,750	2.37	620,580	2.39	620,083	2.39	619,111	2.38	614,637	2.36	582,756	2.20	612,320	2.35	0.0742	3.16
Glutamate	6.75	1,557,635	5.89	1,544,141	5.83	1,519,724	5.72	1,538,403	5.81	1,538,024	5.80	1,475,248	5.51	1,528,863	5.76	0.1350	2.34
Serine	1.25	611,004	0.66	625,400	0.71	607,815	0.65	532,632	0.41	558,360	0.49	541,246	0.44	579,410	0.56	0.1307	23.27
Glutamine	1.25	304,037	-3.84	294,158	-3.89	288,752	-3.91	285,840	-3.93	285,301	-3.93	282,295	-3.95	290,064	-3.91	0.0402	-1.03
Homoserine	85.00	5,871,108	-	5,918,529	-	5,878,054	-	5,662,360	-	5,761,757	-	5,570,060	-	5,776,978	-	-	-
Glycine	1.25	732,137	1.49	741,943	1.51	4,160,729	8.27	690,101	1.41	716,034	1.46	695,135	1.42	1,289,347	2.59	2.7809	107.17
GABA	2.50	1,007,130	2.62	1,033,689	2.70	1,016,576	2.65	1,004,158	2.61	989,917	2.57	1,015,473	2.65	1,011,157	2.63	0.0409	1.55

Standard (Medium conc)																	
	conc. (ug/ml)	Day 1	conc.(ug/ml)	Day 2	conc.(ug/ml)	Day 3	conc.(ug/ml)	Day 4	conc.(ug/ml)	Day 5	conc.(ug/ml)	Day 6	conc.(ug/ml)	mean peak area	conc.Mean	SD conc.	%CV
Aspartate	15.00	2,867,669	13.77	2,888,468	13.87	3,032,517	14.60	3,240,284	15.65	3,265,770	15.78	3,070,318	14.79	3,060,838	14.74	0.8535	5.79
Glutamate	33.75	7,335,401	32.83	7,337,402	32.84	7,728,635	34.66	7,924,431	35.58	7,841,141	35.19	7,515,430	33.67	7,613,740	34.13	1.1885	3.48
Serine	85.00	2,160,141	5.72	2,131,745	5.63	2,391,138	6.48	2,233,949	5.97	2,229,795	5.95	2,146,190	5.68	2,215,493	5.91	0.3142	5.32
Glutamine	6.25	1,527,188	2.36	1,518,354	2.32	1,625,303	2.86	1,641,100	2.94	1,641,915	2.94	1,571,444	2.59	1,587,551	2.67	0.2862	10.72
Homoserine	6.25	5,451,451	-	5,471,433	-	6,104,473	-	5,728,191	-	5,880,267	-	5,367,064	-	5,667,147	-	-	-
Glycine	6.25	3,100,353	6.17	3,075,481	6.13	3,344,190	6.66	3,233,393	6.44	3,175,563	6.32	3,080,722	6.14	3,168,284	6.31	0.2094	3.32
GABA	12.50	4,580,487	12.60	4,574,236	12.59	4,943,104	13.62	4,762,035	13.11	4,586,528	12.62	4,557,137	12.54	4,667,255	12.85	0.4326	3.37

Standard (High conc)																	
	conc. (ug/ml)	Day 1	conc.(ug/ml)	Day 2	conc.(ug/ml)	Day 3	conc.(ug/ml)	Day 4	conc.(ug/ml)	Day 5	conc.(ug/ml)	Day 6	conc.(ug/ml)	mean peak area	conc.Mean	SD conc.	%CV
Aspartate	60.00	11,476,952	57.35	11,915,164	59.57	11,631,618	58.13	12,569,765	62.88	11,608,144	58.01	12,615,850	63.11	11,969,582	59.84	2.5498	4.26
Glutamate	86.40	18,398,967	84.41	17,846,697	81.83	19,194,122	88.12	18,907,962	86.78	19,058,765	87.49	17,316,834	79.36	18,453,891	84.67	3.4791	4.11
Serine	25.00	8,335,999	25.90	8,247,486	25.61	8,233,328	25.56	8,397,096	26.10	8,858,650	27.60	8,173,498	25.37	8,374,343	26.02	0.8170	3.14
Glutamine	25.00	6,232,919	26.22	6,315,289	26.64	6,235,909	26.23	6,506,634	27.61	6,320,436	26.66	6,338,249	26.75	6,324,906	26.68	0.5054	1.89
Homoserine	85.00	5,517,221	-	5,734,660	-	5,485,480	-	5,814,078	-	6,014,584	-	5,886,214	-	5,742,040	-	-	-
Glycine	25.00	12,505,333	24.77	12,208,637	24.18	12,250,026	24.26	12,293,487	24.35	12,965,570	25.68	11,618,162	23.01	12,306,869	24.37	0.8664	3.55
GABA	50.00	18,107,221	50.39	17,763,011	49.43	17,803,530	49.54	17,925,234	49.88	18,491,087	51.46	16,944,635	47.14	17,839,120	49.64	1.4307	2.88

Shimadzu CLASS-VP V 6.14 SP1 External Standard Report

Page 1 of 1

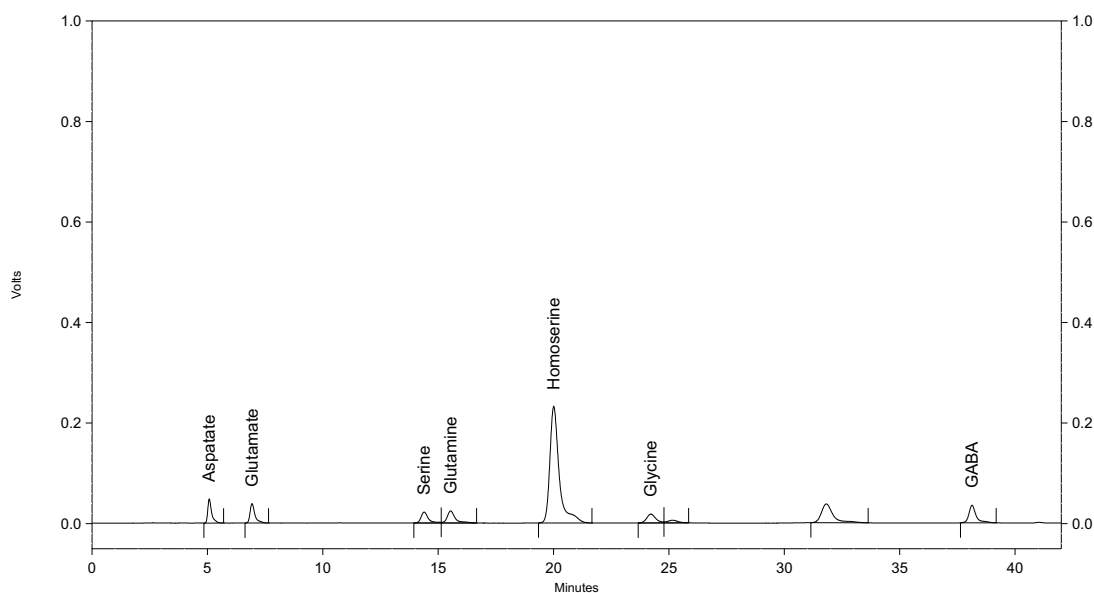
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\RID Pa\18-02-53\Glucose.met

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Standard-%CV\Standard Mix 0.025 mM-004

User: System

Acquired: 4/28/2010 10:30:47 AM

Printed: 4/30/2010 11:03:23 AM



Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1	Aspartate	5.077	555767	47967
2	Glutamate	6.929	561484	38629
3	Serine	14.387	477575	21824
4	Glutamine	15.537	574592	23908
5	Homoserine	20.004	6507827	231592
6	Glycine	24.213	483499	17532
9	GABA	38.129	757639	34877
Totals			9918384	416327

รูปที่ 26 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.02 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ คือ แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา

Shimadzu CLASS-VP V 6.14 SP1 External Standard Report

Page 1 of 1

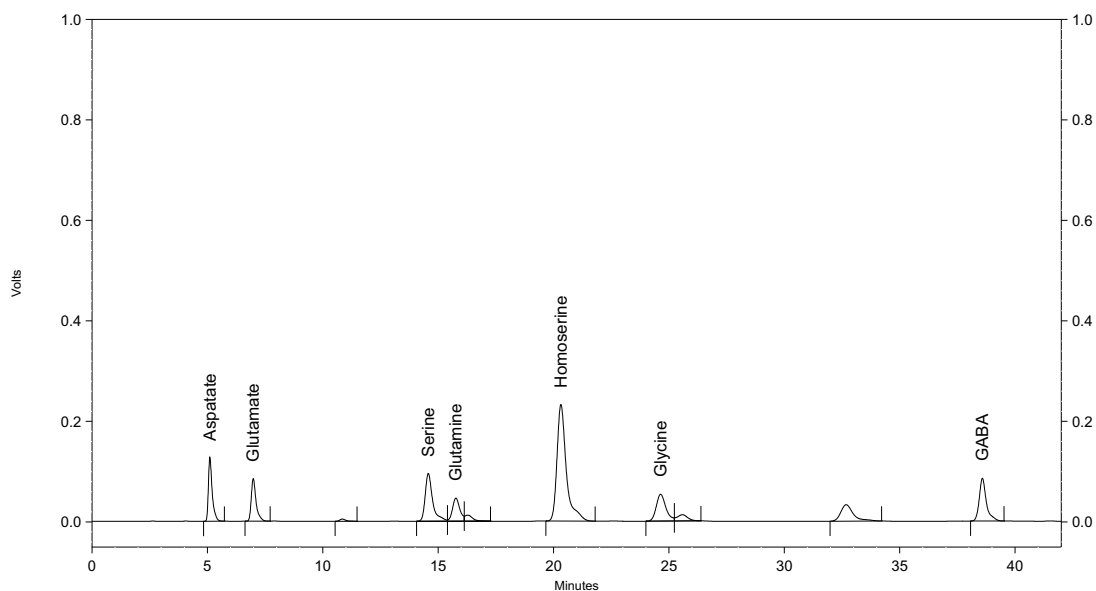
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\RID Pa\18-02-53\Glucose.met

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Standard-%CV\Standard Mix 0.05 mM-003

User: System

Acquired: 4/27/2010 2:39:06 PM

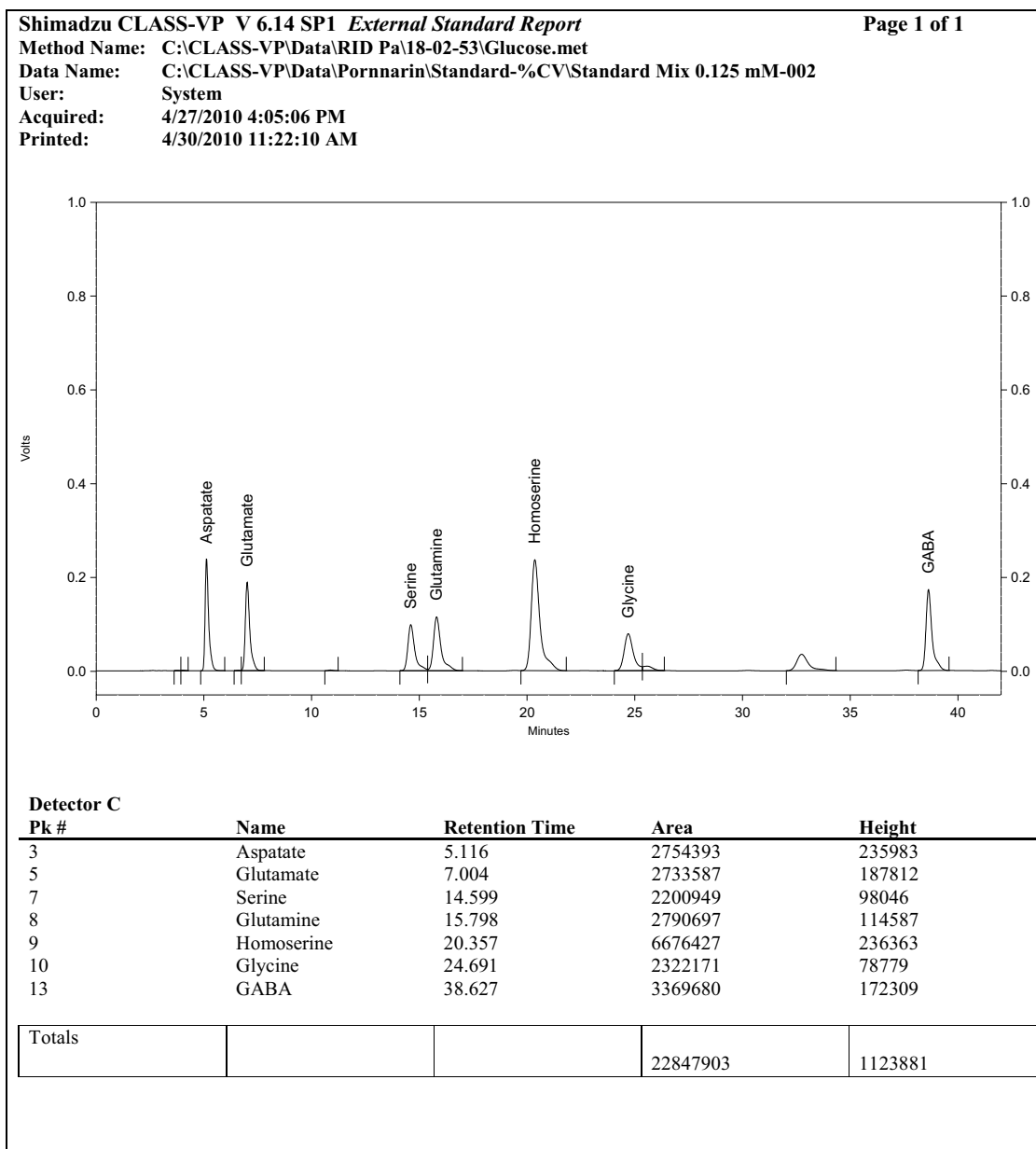
Printed: 4/30/2010 11:38:32 AM



Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1	Aspartate	5.104	1464591	126559
2	Glutamate	6.982	1227711	84415
4	Serine	14.568	2136431	94930
5	Glutamine	15.762	1014556	45871
7	Homoserine	20.314	6545876	231958
8	Glycine	24.635	1544782	53452
11	GABA	38.579	1816312	85192
Totals			15750260	722377

รูปที่ 27 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ คือ แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา



รูปที่ 28 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.125 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ

คือ แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา

Shimadzu CLASS-VP V 6.14 SP1 External Standard Report

Page 1 of 1

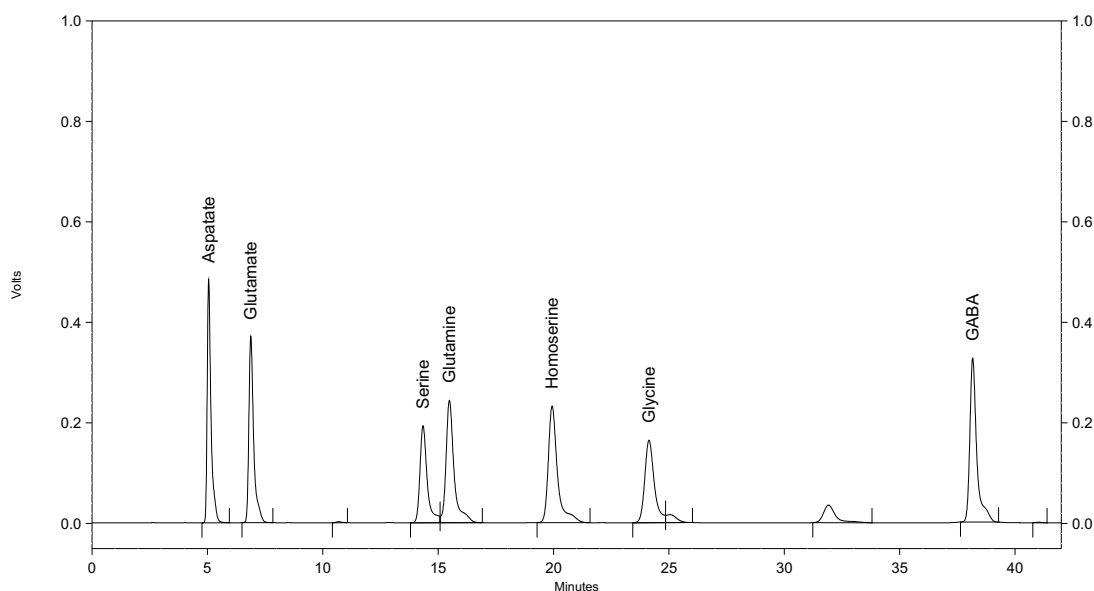
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\RID Pa\18-02-53\Glucose.met

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Standard-%CV\Standard Mix 0.25 mM-003

User: System

Acquired: 4/28/2010 11:14:33 AM

Printed: 4/30/2010 10:19:11 AM



Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1	Aspartate	5.051	5575224	480865
2	Glutamate	6.877	5371255	370865
4	Serine	14.339	4239633	193107
5	Glutamine	15.484	5916320	243313
6	Homoserine	19.935	6463737	232031
7	Glycine	24.132	4738974	164181
10	GABA	38.159	6851129	326550
Totals			39156273	2010912

รูปที่ 29 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.25 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ คือ แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา

Shimadzu CLASS-VP V 6.14 SP1 External Standard Report

Page 1 of 1

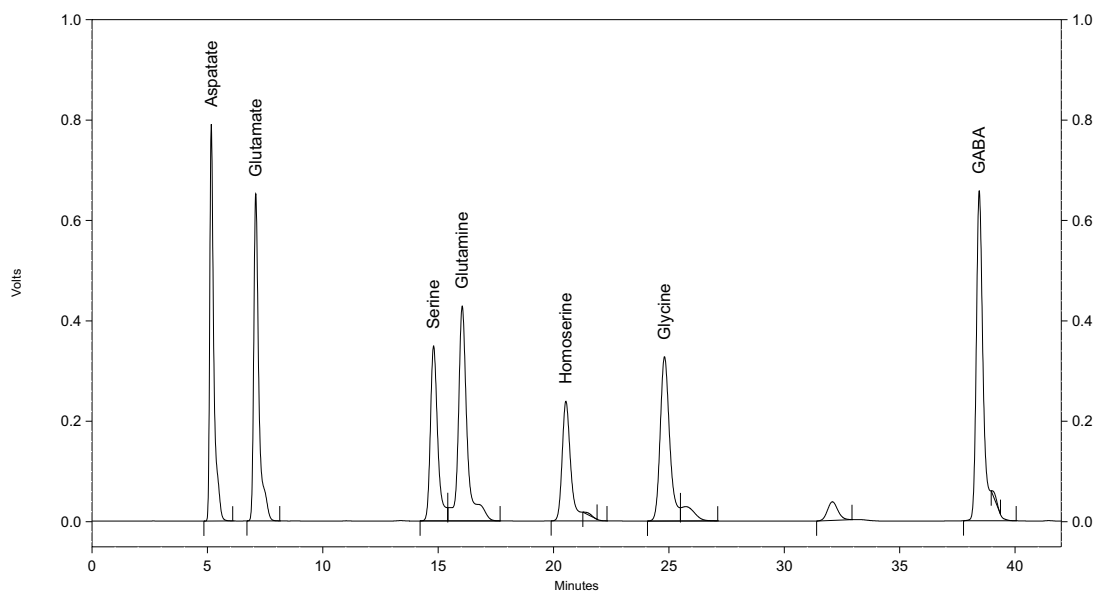
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\RID Pa\18-02-53\Glucose.met

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Standard-%CV\Standard Mix 0.5 mM-006

User: System

Acquired: 4/30/2010 12:01:26 PM

Printed: 4/30/2010 3:41:37 PM

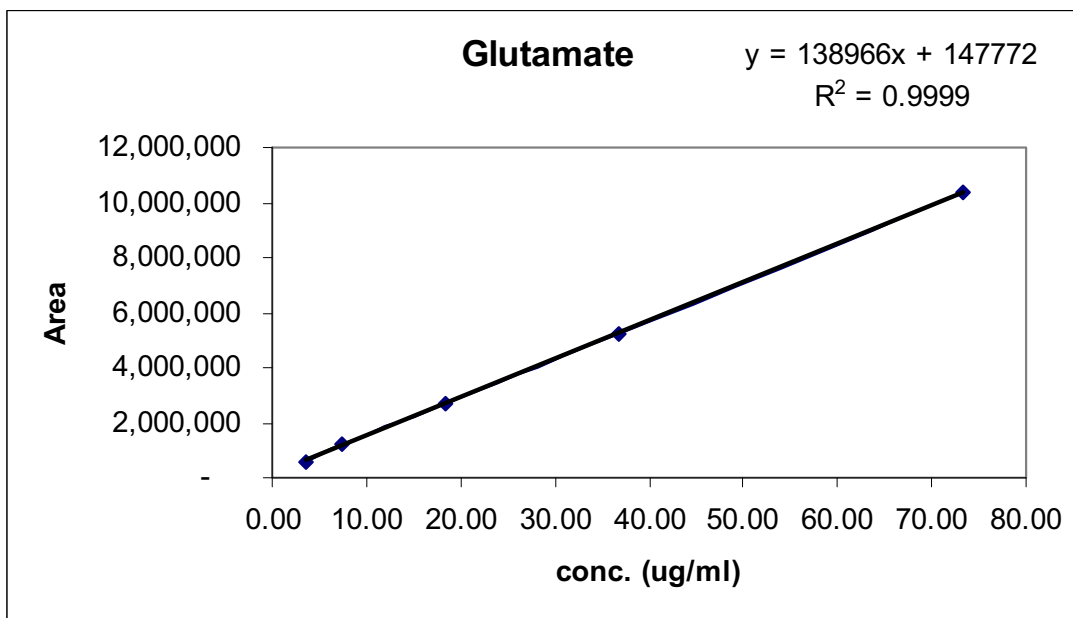
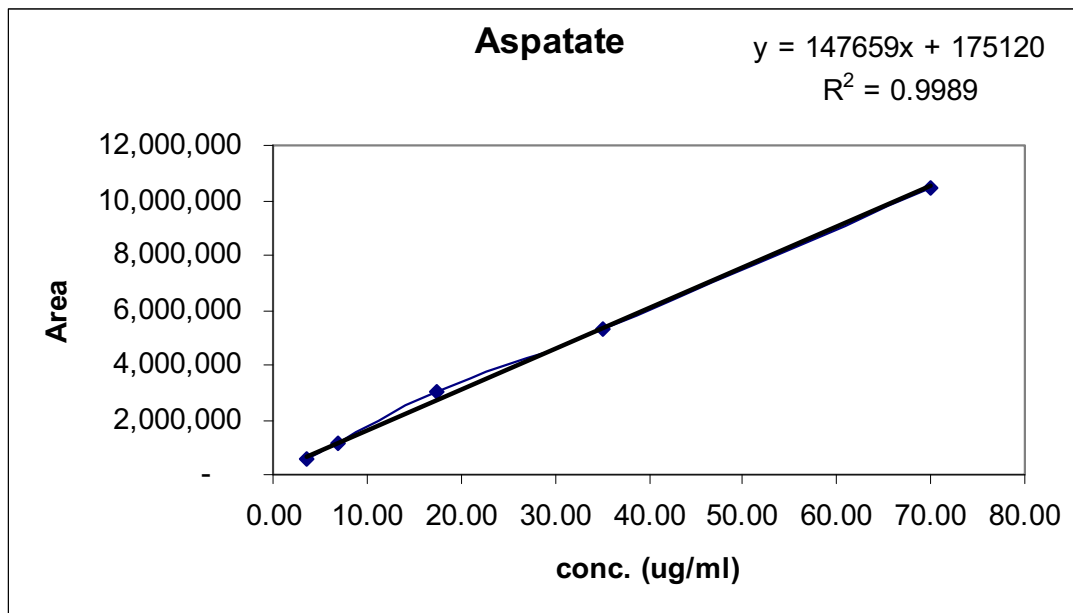


Detector C

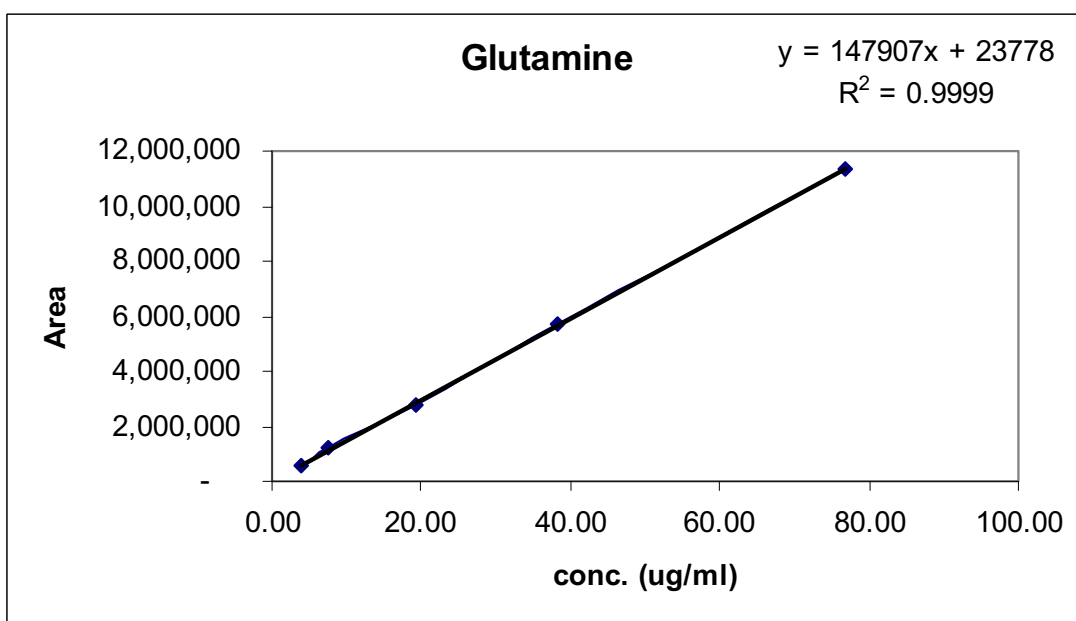
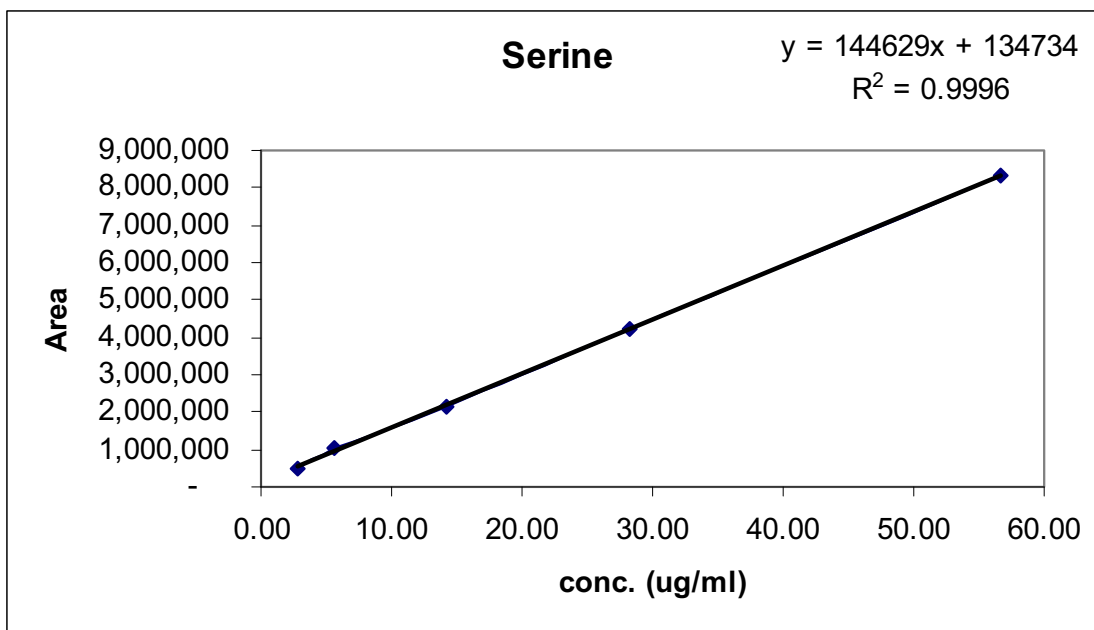
Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1	Aspartate	5.165	9607798	785333
2	Glutamate	7.091	9982849	651292
3	Serine	14.799	7647111	348159
4	Glutamine	16.038	11311119	427292
5	Homoserine	20.531	6512263	238185
7	Glycine	24.803	9396453	327064
10	GABA	38.443	14108522	657050
Totals			68566114	3434375

รูปที่ 30 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ

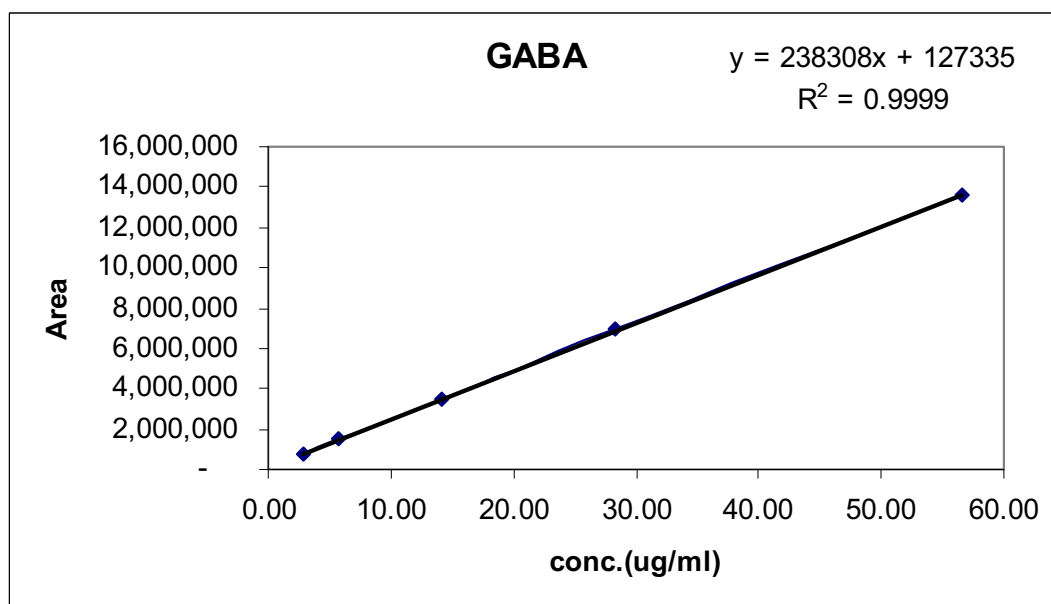
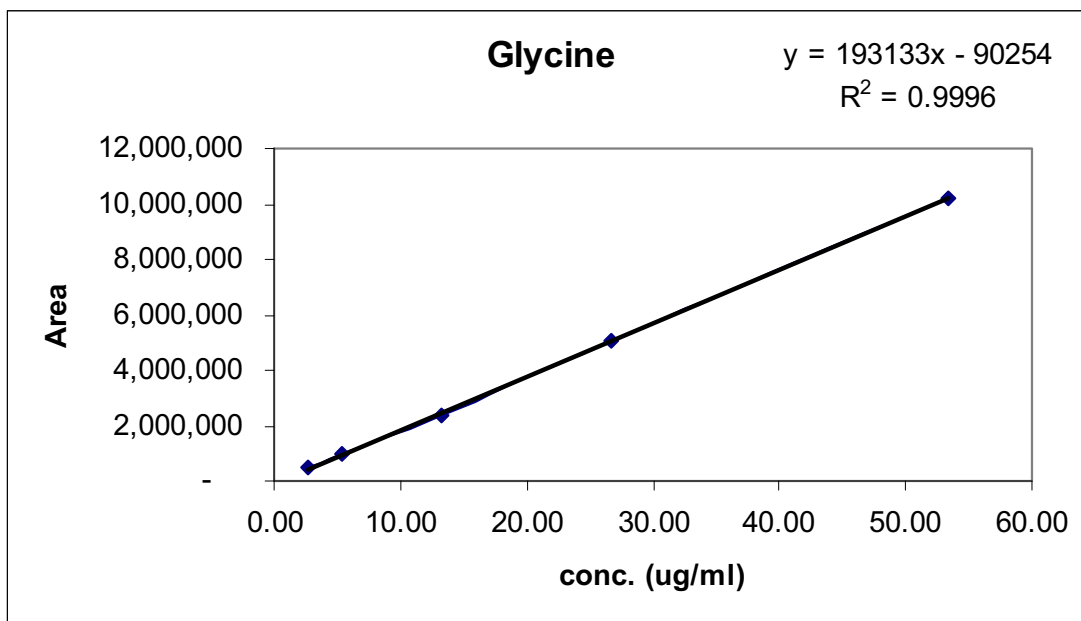
คือ แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา



รูปที่ 31 กราฟเปรียบเทียบมาตรฐานของแอสปาร์เตต (บน) กลูตาเมต (ล่าง)



รูปที่ 32 กราฟเปรียบเทียบมาตรฐานของเซอรีน (บน) กลูตามีน (ล่าง)



รูปที่ 33 กราฟเปรียบเทียบมาตรฐานของเซอริน (บน) ไกลซีน (กลาง) กาบา (ล่าง)

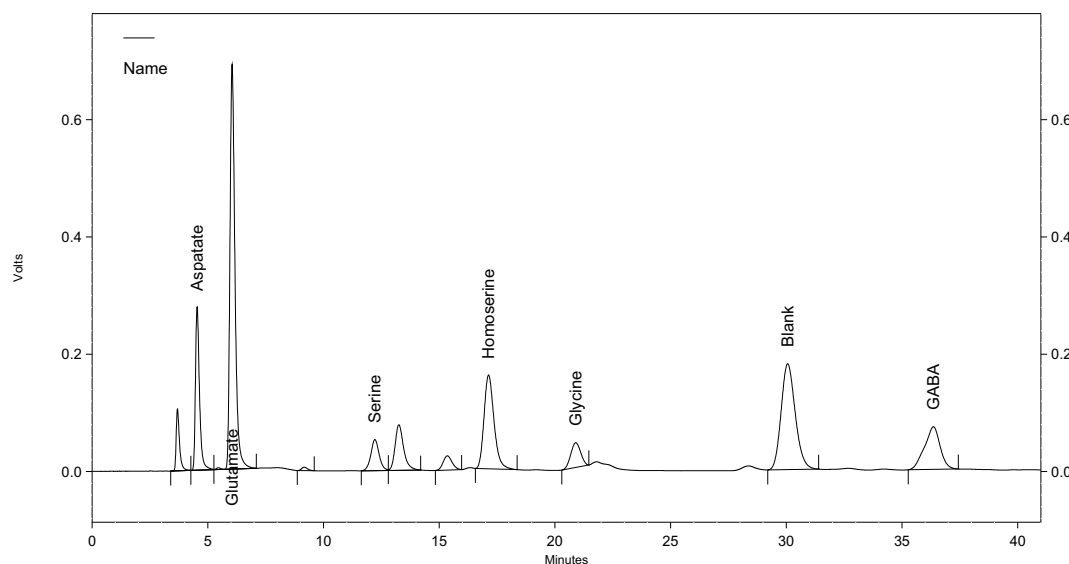
6. ผลการวิเคราะห์ระดับกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ประกอบด้วย peak ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้แก่ แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบา ที่ได้จากการฉีด supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ของหนูกลุ่ม control sham กลุ่ม control A β กลุ่ม A β +BN0.5 กลุ่ม A β +BN5 และกลุ่ม A β +BN10 แสดงดังรูปที่ 34, 35, 36, 37, และ 38 ตามลำดับ

เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้ peak ของสารต่างๆที่ได้จากโครมาโตแกรมมาคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นโดยใช้เทียบกับ standard calibration curve ที่ได้ แล้วนำมา plot กราฟแยกตามสารแต่ละตัว พบว่า หนูกลุ่ม control sham กลุ่ม control A β กลุ่ม A β +BN0.5 กลุ่ม A β +BN5 และกลุ่ม A β +BN10 มีค่าเฉลี่ยของระดับแอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน ไกลซีน และกาบา ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส โดยมีหน่วยเป็นต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเนื้อสมอง แสดงเป็นกราฟดังรูปที่ 39, 40, และ 41 ตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง หรือ control A β มีค่าระดับของกลูตาเมต ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมปกติที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องหรือกลุ่ม control sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$; one-way ANOVA and Dunnett post hoc test) ส่วนกรดอะมิโนชนิดอื่นๆในหนูกลุ่ม control A β มีแนวโน้มของการลดลง (แอสปาร์เตต) และเพิ่มขึ้น (กลูตาเมต) หรือไม่เปลี่ยนแปลง (ไกลซีนและกาบา) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$; one-way ANOVA) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control sham และการป้อนกลูตาเมตขนาด 0.5, 5 และ 10 ก./กก.น้ำหนักตัวเป็นเวลานานติดต่อกัน 90 วันในหนูกลุ่ม กลุ่ม A β +BN 0.5 กลุ่ม A β +BN 5 และกลุ่ม A β +BN 10 ตามลำดับ มีผลทำให้หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องด้วย A β peptide เข้าในสมอง มีค่าระดับของแอสปาร์เตต กลูตาเมต และ เซอรีน เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม control A β ในขณะที่ระดับของ กลูตามีน ไกลซีนและกาบา ของหนูกลุ่มต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงในทางลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม control sham ($p > 0.05$; one-way ANOVA)

c Area % Report Page 1 of 1
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\IS-Glutamate\Glutamate.met
Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\IS-Glutamate\hippocampus\Sham\hippocampus 9-001
User: System
Acquired: 1/19/2010 12:22:17 PM
Printed: 1/20/2010 1:21:28 PM

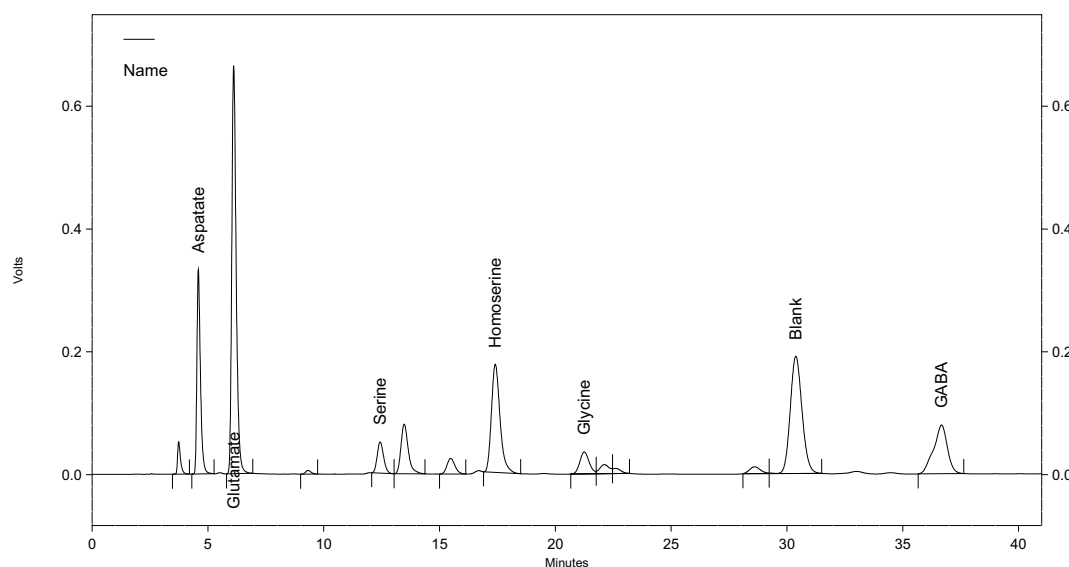


Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1		3.687	1053543	104182
2	Aspartate	4.535	3379082	270556
3	Glutamate	6.047	10417029	685800
4		9.164	102249	5763
5	Serine	12.217	1317453	53006
6	Glutamine	13.254	1993198	77659
7		15.348	650428	24218
8	Homoserine	17.128	4798833	159501
9	Glycine	20.897	1260927	42091
10	Blank	30.055	7645046	180405
11	GABA	36.353	3408495	72622
Totals			36026284	1675804

รูปที่ 34 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ประกอบด้วย peak ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ได้จากการฉีด supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูกลุ่ม control sham

Method Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\IS-Glutamate\Glutamate.met
 Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\IS-Glutamate\hippocampus\Control\hippocampus 5-001
 User: System
 Acquired: 1/2/2010 4:35:39 PM
 Printed: 1/20/2010 1:16:21 PM

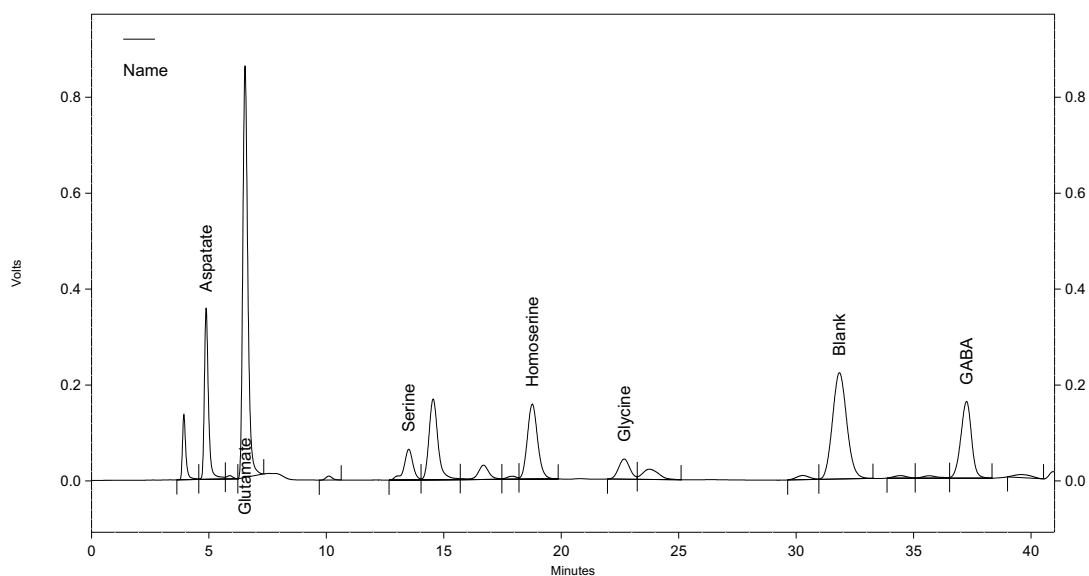


Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1		3.733	464655	49290
2	Aspartate	4.583	3533515	329620
3	Glutamate	6.107	8754571	654669
4		9.319	96654	6004
5	Serine	12.430	968561	50210
6		13.469	1768915	80126
7		15.476	610507	25404
8	Homoserine	17.402	4552158	175137
9	Glycine	21.243	1007407	35673
10		22.112	438492	14872
11		22.733	195433	7157
12		28.601	371912	11220
13	Blank	30.378	6736324	190844
14	GABA	36.671	3268069	79085
Totals			32767174	1709309

รูปที่ 35 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ประกอบด้วย peak ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ได้จากการฉีด supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูกลุ่ม control A β

c Area % Report Page 1 of 1
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\IS-Glutamate\Glutamate.met
Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\IS-Glutamate\hippocampus\BN 05\hippocampus 17-001
User: System
Acquired: 1/20/2010 5:26:01 PM
Printed: 1/21/2010 10:08:33 AM

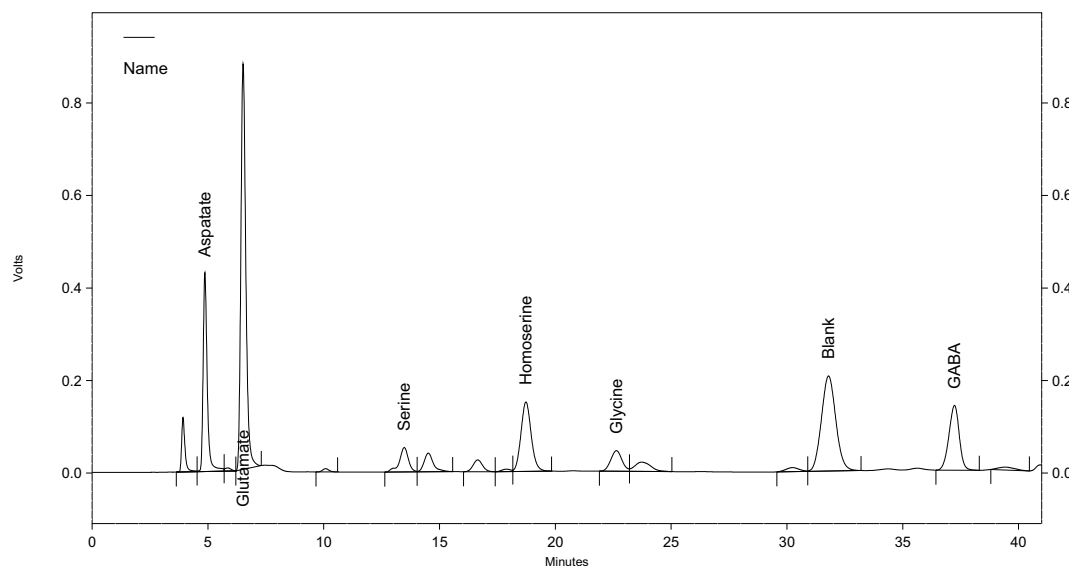


Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1		3.929	1349425	130978
2	Aspartate	4.877	4348896	352283
3		5.879	124879	7103
4	Glutamate	6.533	12642119	840731
5		10.099	157323	8154
6	Serine	13.502	1688788	63576
7		14.541	4480712	168049
8		16.685	968437	29808
9		17.900	184901	6388
10	Homoserine	18.761	4753981	156179
11	Glycine	22.673	1404818	41951
12		23.744	1018106	21312
13		30.279	341136	8679
14	Blank	31.836	9391772	221256
15		34.424	195698	5198
16		35.567	212566	4403
17	GABA	37.248	5036556	159674
18		39.558	330625	6289
Totals			48630737	2232012

รูปที่ 36 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ประกอบด้วย peak ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ได้จากการฉีด supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูกลุ่ม A β +BN0.5

c Area % Report Page 1 of 1
 Method Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\IS-Glutamate\Glutamate.met
 Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\IS-Glutamate\hippocampus\BN 5\hippocampus 30-001
 User: System
 Acquired: 1/20/2010 6:54:30 PM
 Printed: 1/21/2010 10:13:18 AM



Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1		3.919	1182083	116709
2	Aspartate	4.862	5302356	420563
3		5.900	124582	6727
4	Glutamate	6.513	13016745	871525
5		10.077	137450	7124
6	Serine	13.471	1431987	52626
7		14.510	1106203	40260
8		16.644	726871	25523
9		17.833	145474	5100
10	Homoserine	18.725	4622141	149911
11	Glycine	22.631	1503478	44415
12		23.721	972673	20107
13		30.236	348435	8702
14	Blank	31.790	8860267	205457
15	GABA	37.230	4346076	139602
16		39.417	308276	6188
Totals			44135098	2120539

รูปที่ 37 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ประกอบด้วย peak ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ได้จากการฉีด supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูกลุ่ม A β +BN 5

c Area % Report Page 1 of 1

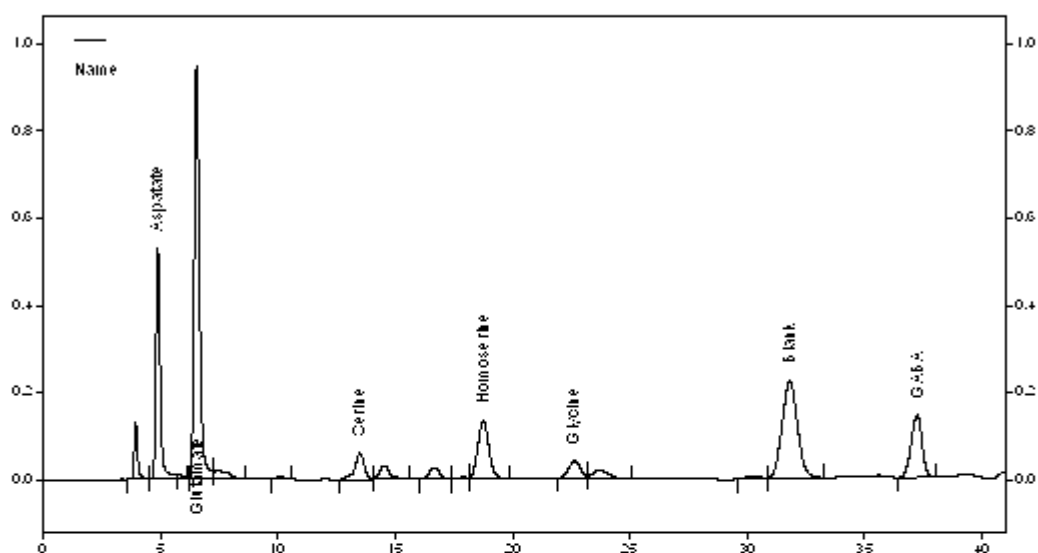
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\Porrmarin\IS-Glutamate\Glutamate.met

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Porrmarin\IS-Glutamate\hippocampus\BN 10\hippocampus 40-001

User: System

Acquired: 1/20/2010 8:24:53 PM

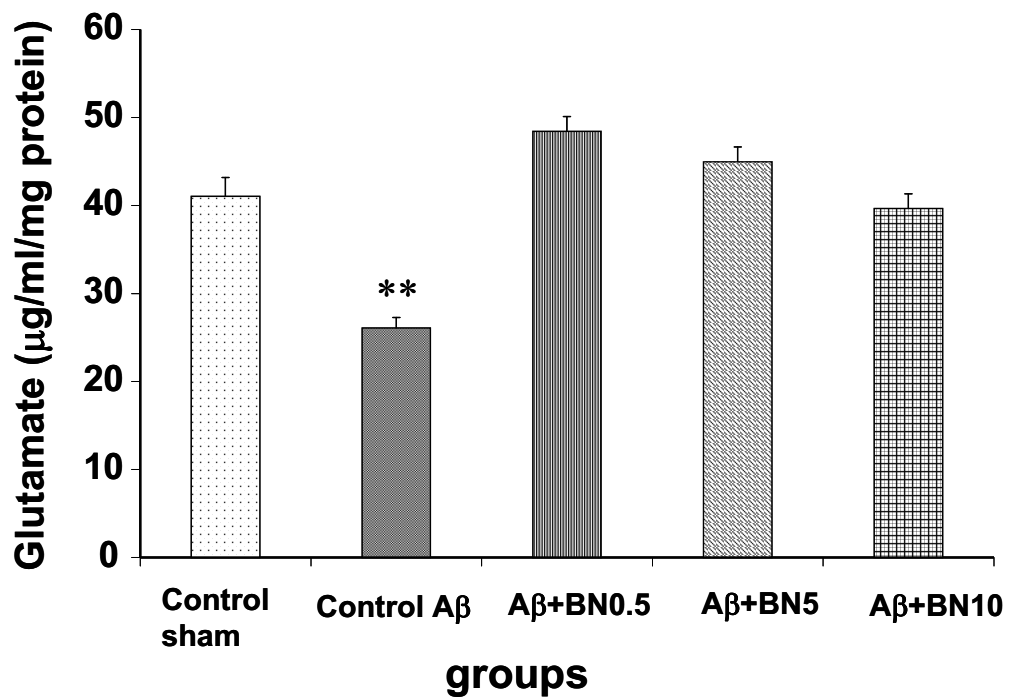
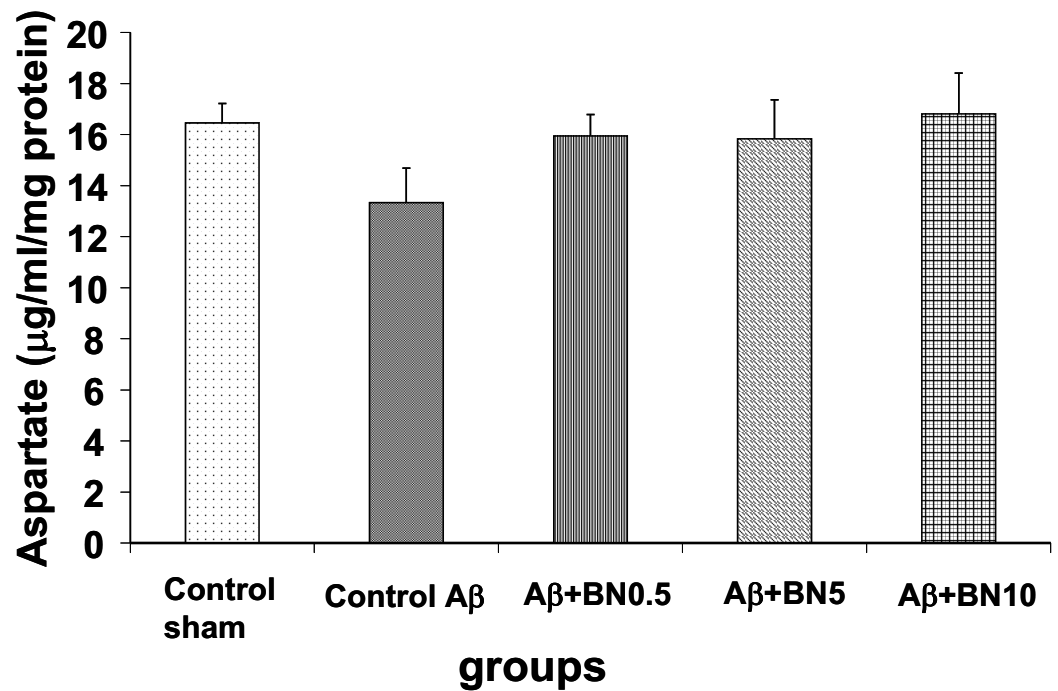
Printed: 1/21/2010 10:17:44 AM



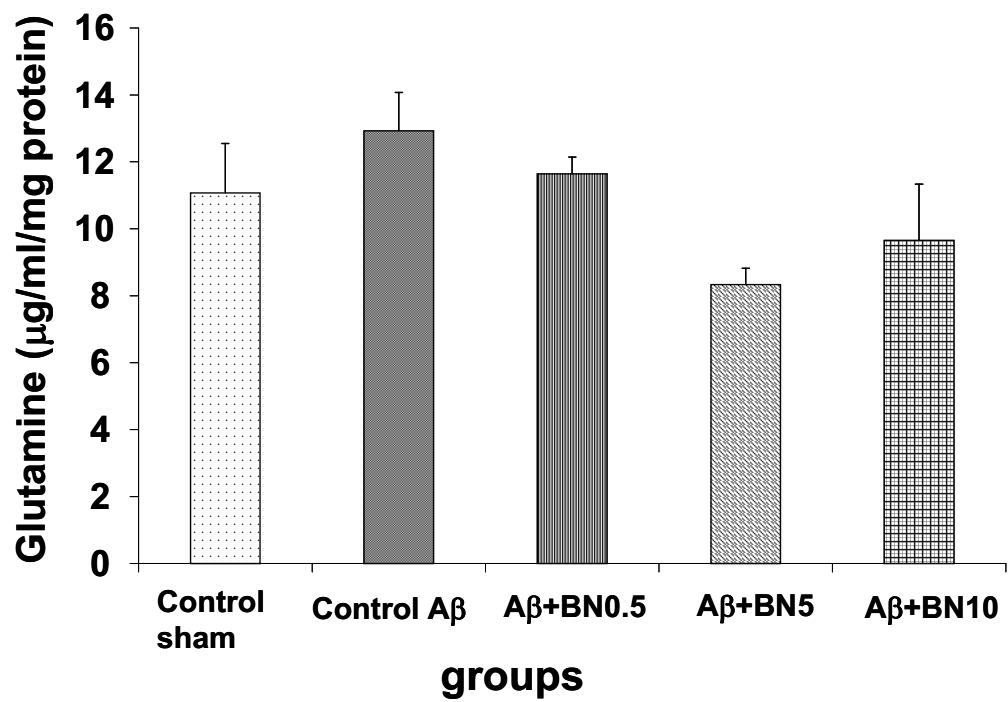
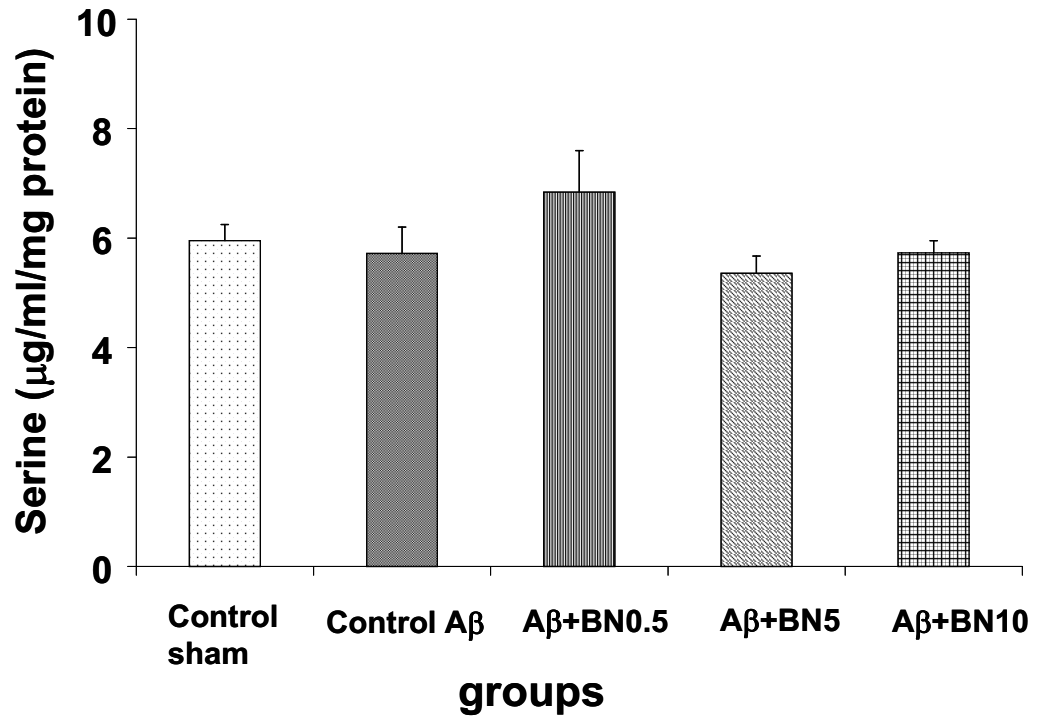
Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1		3.925	1340565	125849
2	Aspartate	4.870	7006839	518064
3		5.867	27013	2590
4	Glutamate	6.521	14977395	939763
5		7.767	818471	16983
6		10.088	141031	7021
7	Serine	13.486	1682482	59478
8		14.525	911737	30594
9		16.656	785465	26555
10		17.833	119636	3950
11	Homoserine	18.742	4338642	133666
12	Glycine	22.640	1449522	40781
13		23.709	937106	19401
14		30.259	327244	7929
15	Blank	31.805	10161843	222375
16	GABA	37.232	4613962	141740
Totals			49638955	2296738

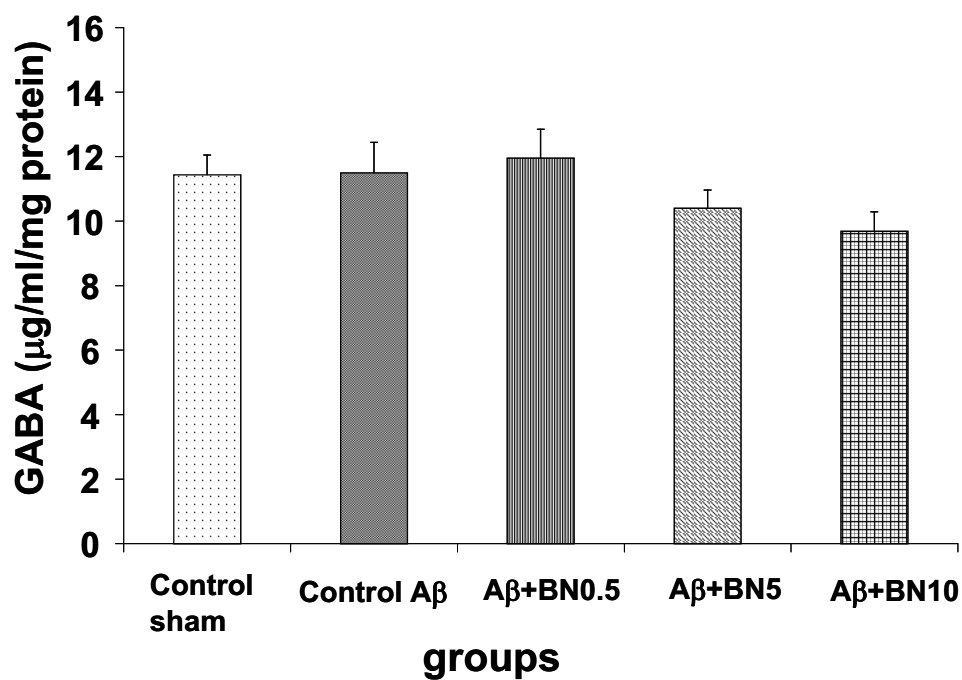
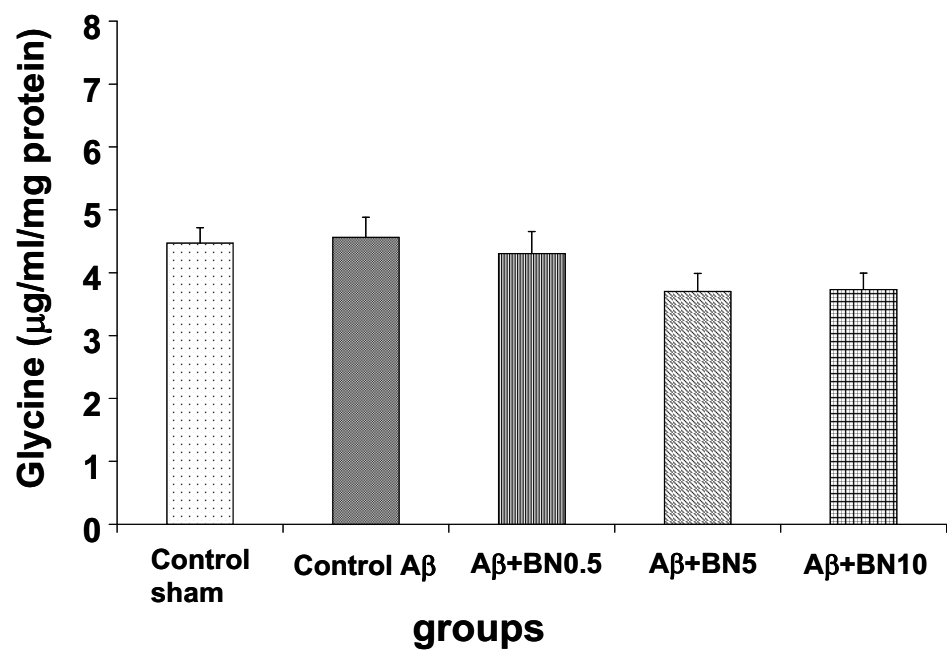
รูปที่ 38 ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ประกอบด้วย peak ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ได้จากการฉีด supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูกลุ่ม Aβ+BN 10



รูปที่ 39 ระดับของแอสปาทเตต (กราฟบน) และกลูตาเมต (กราฟล่าง) ที่วัดได้จาก supernatant สมของส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูกลุ่ม control sham กลุ่ม control Aβ กลุ่ม Aβ+BN0.5 กลุ่ม Aβ+BN5 และกลุ่ม Aβ+BN10 พบว่าในหนูกลุ่ม Control Aβ มีระดับของกลูตาเมตต่ำกว่ากลุ่มอื่นน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (** = $p < 0.01$; one-way ANOVA and Dunnett post hoc test)



รูปที่ 40 ระดับของ เซอรีน (กราฟบน) กลูตามีน (กราฟล่าง) ที่วัดได้จาก supernatant สมองส่วน ฮิปโปแคมปัสของหนูกลุ่ม control sham กลุ่ม control Aβ กลุ่ม Aβ+BN0.5 กลุ่ม Aβ+BN5 และกลุ่ม Aβ+BN10



รูปที่ 41 ระดับของไกลซีน (กราฟบน) กาบามา (กราฟล่าง) ที่วัดได้จาก supernatant สมของส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูกลุ่ม control sham กลุ่ม control Aβ กลุ่ม Aβ+0.5 กลุ่ม Aβ+BN5 และกลุ่ม Aβ+BN10

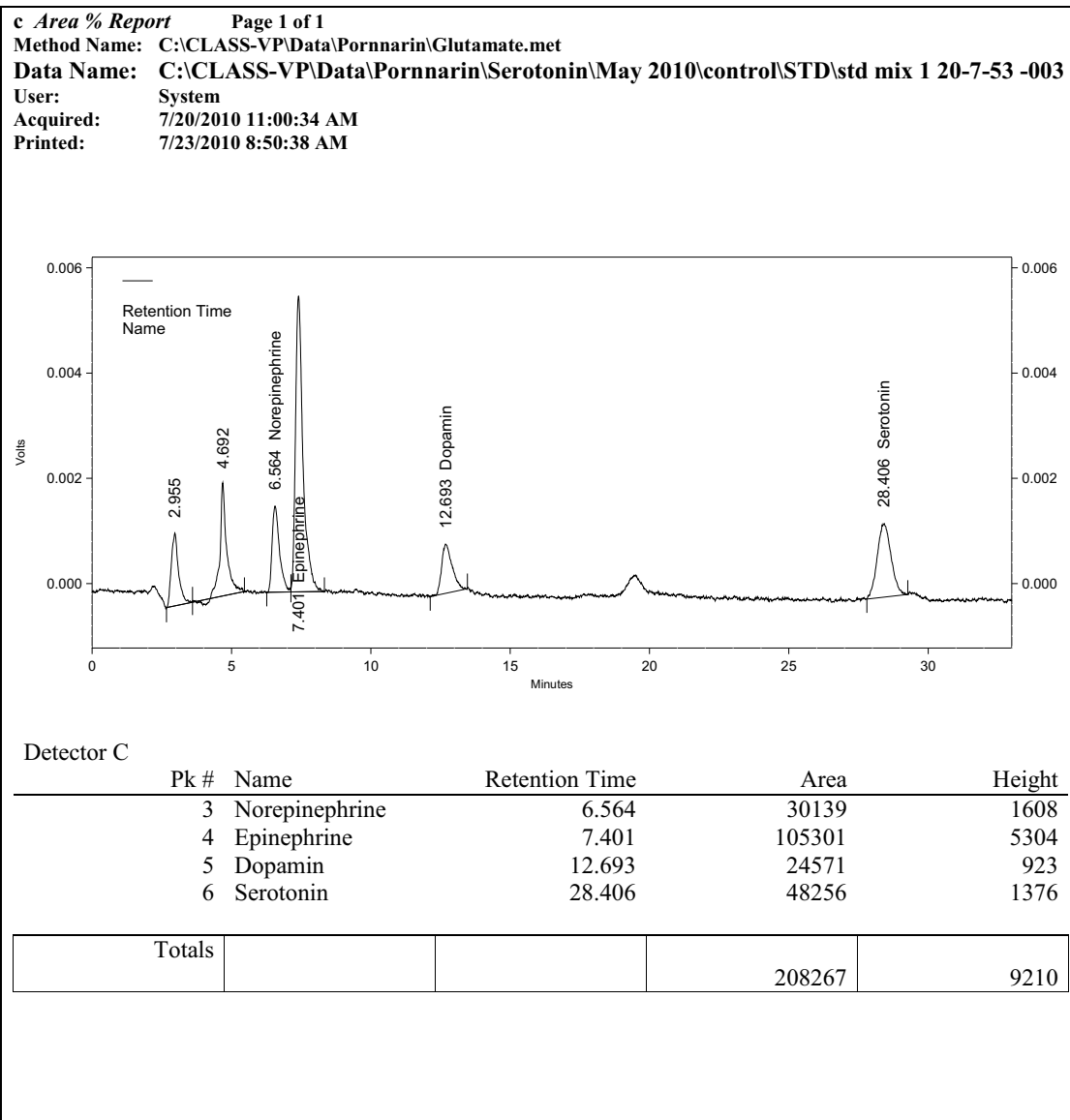
7. ผลการทำ Standard calibration curve สำหรับการวัดซีโรโทนิน นอร์อิพิเนฟฟิน อิพิเนฟฟิน และ โดปามีน

การวิเคราะห์สารมาตรฐานของสารสื่อประสาท นอร์อิพิเนฟฟิน อิพิเนฟฟิน โดปามีน และ ซีโรโทนิน ใช้เครื่อง HPLC ร่วมกับเครื่อง fluorescence detector และใช้โปรแกรม Class-VP (Shimadzu Scientific Instruments, Japan) เพื่อวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC) ในการเตรียมสารมาตรฐานได้คำนวณเป็นความเข้มข้นเป็นหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ng/ml) ได้ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน 4 ชนิด ชนิดละ 5 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยของสารมาตรฐานต่างๆ แสดงดังตารางที่ 8 และตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานต่างๆ แสดงดังรูปที่ 46 ตามลำดับ และเมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรมและปริมาณความเข้มข้นหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐานนอร์อิพิเนฟฟิน อิพิเนฟฟิน โดปามีน และซีโรโทนิน จะได้กราฟดังรูปที่ 47-48 ตามลำดับ ข้อมูลนี้ใช้ในการคำนวณหาระดับกรดอะมิโนจากตัวอย่าง supernatant คิดต่อมิลลิลิตรโปรตีนของสมองต่อไป

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบความแม่นยำของการฉีดสารมาตรฐานชนิดต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC และ fluorescence detector นี้ เพื่อหา interday และ intraday variation ด้วยการเตรียมสาร 3 ความเข้มข้นต่อชนิดของสารมาตรฐานนอร์อิพิเนฟฟิน อิพิเนฟฟิน โดปามีน และซีโรโทนิน ทำการฉีด 6 ครั้งภายในวันเดียวกัน คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง HPLC คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และค่า % coefficients of variation (%CV) ข้อมูลที่ได้แสดงดังตารางที่ 9 และ 10 ตามลำดับ

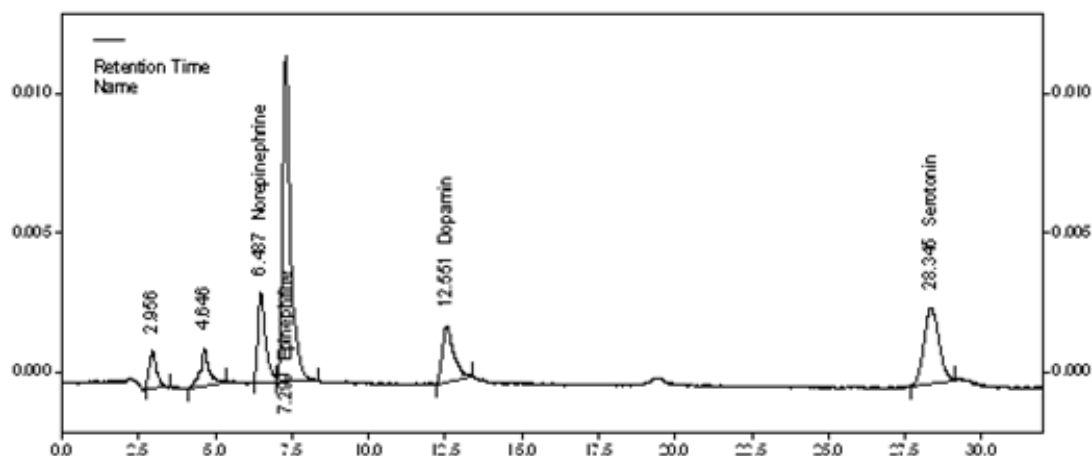
ตารางที่ 8 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน นอร์อิพิเนฟริน อิพิเนฟริน โดปามีนและซีโรโทนิน 5 ความเข้มข้นหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเฉลี่ยที่ได้จากการฉีด 3 ครั้ง

Standard mix 1					
Standard	Std.conc (ng/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean Area
Norepinephrine	35	33588	30471	30139	31399.33
Epinephrine	75	114277	105231	105301	108269.67
Dopamine	25	29629	25328	24571	26509.33
Serotonin	20	48918	46824	48256	47999.33
Standard mix 2					
Standard	Std.conc (ng/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean Area
Norepinephrine	70	56985	55956	56155	56365.33
Epinephrine	150	211181	209466	209423	210023.33
Dopamine	50	50813	60685	50963	54153.67
Serotonin	40	93366	91350	92875	92530.33
Standard mix 3					
Standard	Std.conc (ng/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean Area
Norepinephrine	140	108532	108758	107422	108237.33
Epinephrine	300	415128	414414	411499	413680.33
Dopamine	100	128474	116564	117945	120994.33
Serotonin	80	175320	173410	170331	173020.33
Standard mix 4					
Standard	Std.conc (ng/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean Area
Norepinephrine	200	153006	153552	153179	153245.67
Epinephrine	400	535550	539344	533267	536053.67
Dopamine	150	188832	191798	190229	190286.33
Serotonin	120	287129	286092	284601	285940.67
Standard mix 5					
Standard	Std.conc (ng/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean Area
Norepinephrine	280	211548	212427	216769	213581.33
Epinephrine	600	817879	812536	829857	820090.67
Dopamine	200	255519	253424	259414	256119.00
Serotonin	160	379459	372188	377169	376272.00



รูปที่ 42 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น mix 1 ของสารมาตรฐานชนิดต่างๆคือ นอร์อิพิเนฟริน อิพิเนฟริน โดปามินและซีโรโทนิน ที่ความเข้มข้น 35, 75, 25, และ 20 นาโนกรัม/ มิลลิลิตร ตามลำดับ

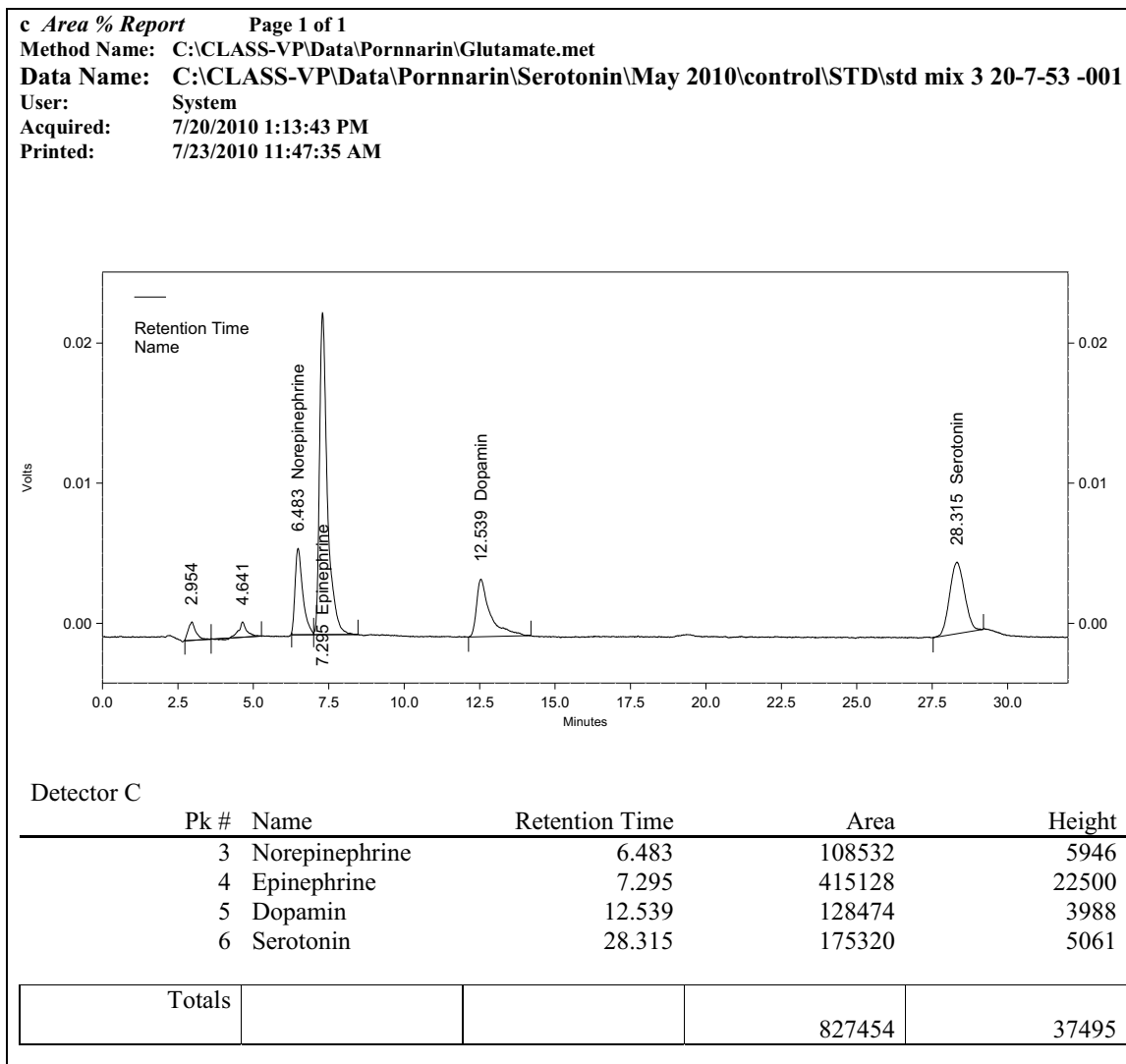
e Area % Report Page 1 of 1
 Method Name: C:\CLASS\VP\Data\Poramarin\Glutamate.mxd
 Data Name: C:\CLASS\VP\Data\Poramarin\Serotonin\May 2010\control\STD mix 2 20-7-53 .001
 User: System
 Acquired: 7/20/2010 11:34:43 AM
 Printed: 7/23/2010 8:57:21 AM



Detector C

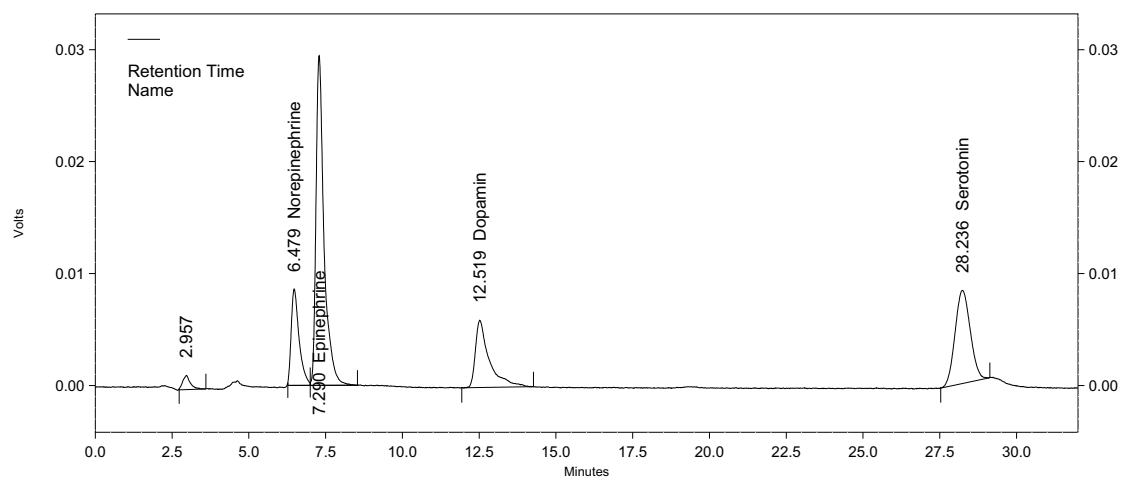
Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
3	Norepinephrine	6.487	56985	3105
4	Epinephrine	7.299	211181	11487
5	Dopamine	12.551	50813	1964
6	Serotonin	28.345	93366	2700
Totals			412343	19256

รูปที่ 43 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น mix 2 ของสารมาตรฐานชนิดต่างๆคือ
 นอร์อิพิเนฟริน อิพิเนฟริน โดปามีนและซีโรโทนิน ที่ความเข้มข้น 70, 150, 50, และ 40 นาโนกรัม/
 มิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 44 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น mix 3 ของสารมาตรฐานชนิดต่างๆคือ นอร์อิพิเนฟริน อีพิเนฟริน โดปามีนและซีโรโทนิน ที่ความเข้มข้น 140, 300, 100, และ 80 นาโนกรัม/ มิลลิลิตร ตามลำดับ

c Area % Report Page 1 of 1
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Glutamate.met
Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Serotonin\May 2010\control\STD\std mix 4 20-7-53 -001
User: System
Acquired: 7/20/2010 2:54:02 PM
Printed: 7/23/2010 11:50:55 AM

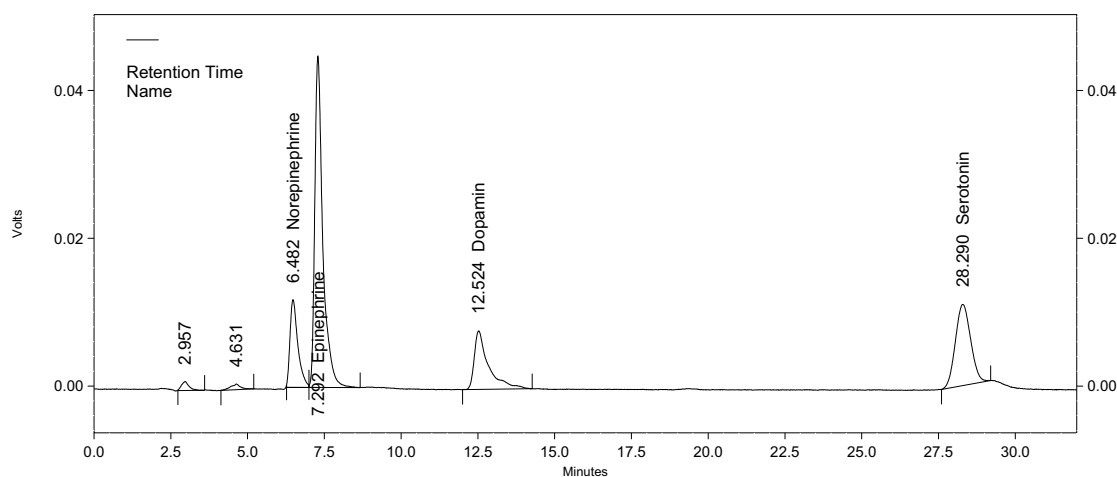


Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
2	Norepinephrine	6.479	153006	8226
3	Epinephrine	7.290	535550	28703
4	Dopamin	12.519	188832	5899
5	Serotonin	28.236	287129	8296
Totals			1164517	51124

รูปที่ 45 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น mix 4 ของสารมาตรฐานชนิดต่างๆคือ นอร์อิพิเนฟริน อีพิเนฟริน โดปามีนและซีโรโทนิน ที่ความเข้มข้น 200, 400, 150, และ 120 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

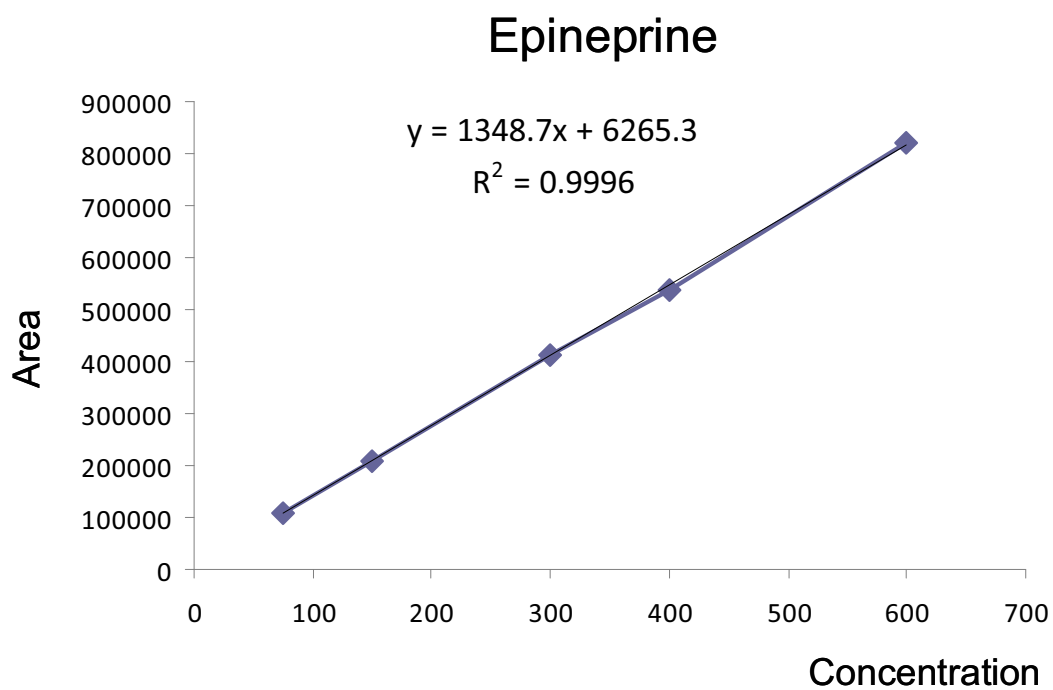
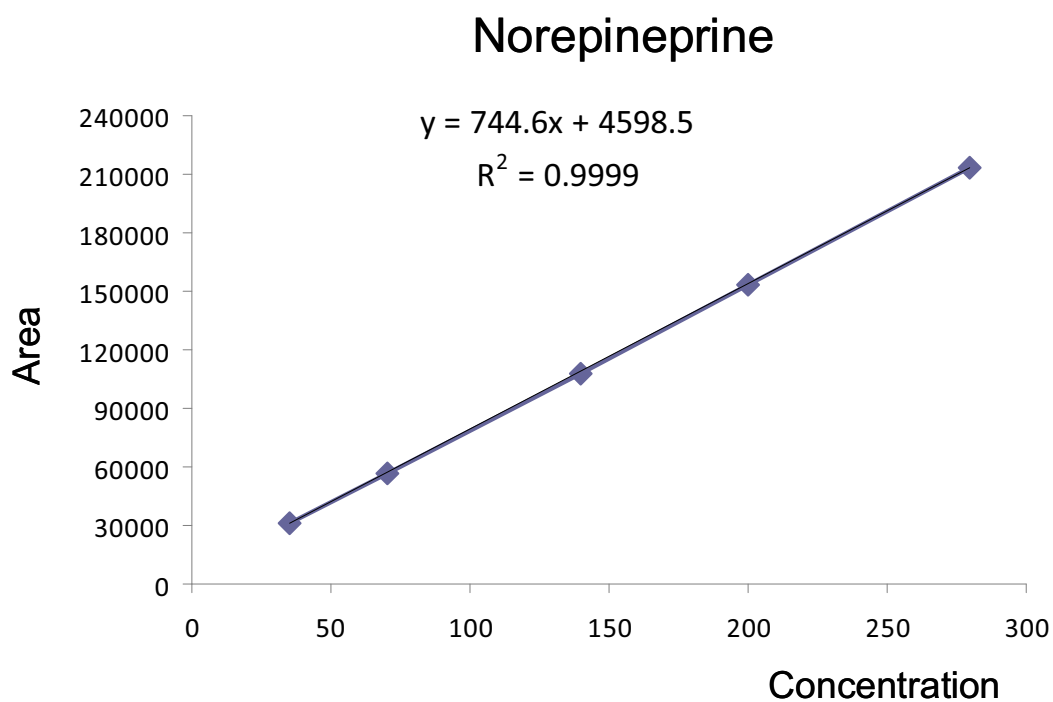
c Area % Report Page 1 of 1
 Method Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Glutamate.met
 Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Serotonin\May 2010\control\STD\std mix 5 20-7-53 -001
 User: System
 Acquired: 7/20/2010 4:32:42 PM
 Printed: 7/23/2010 11:54:08 AM



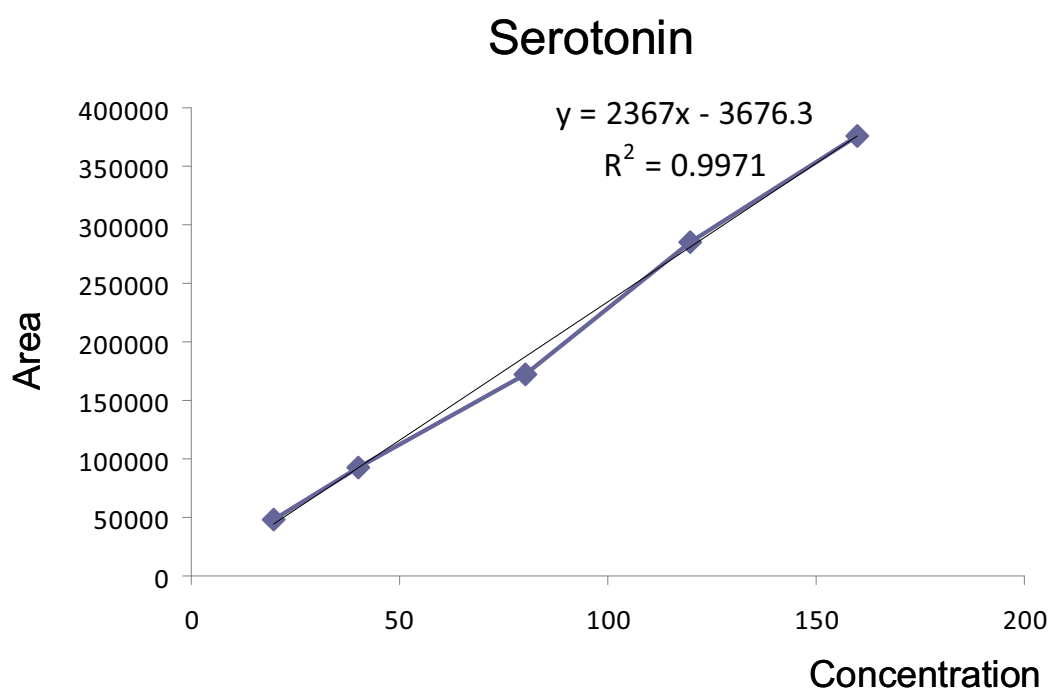
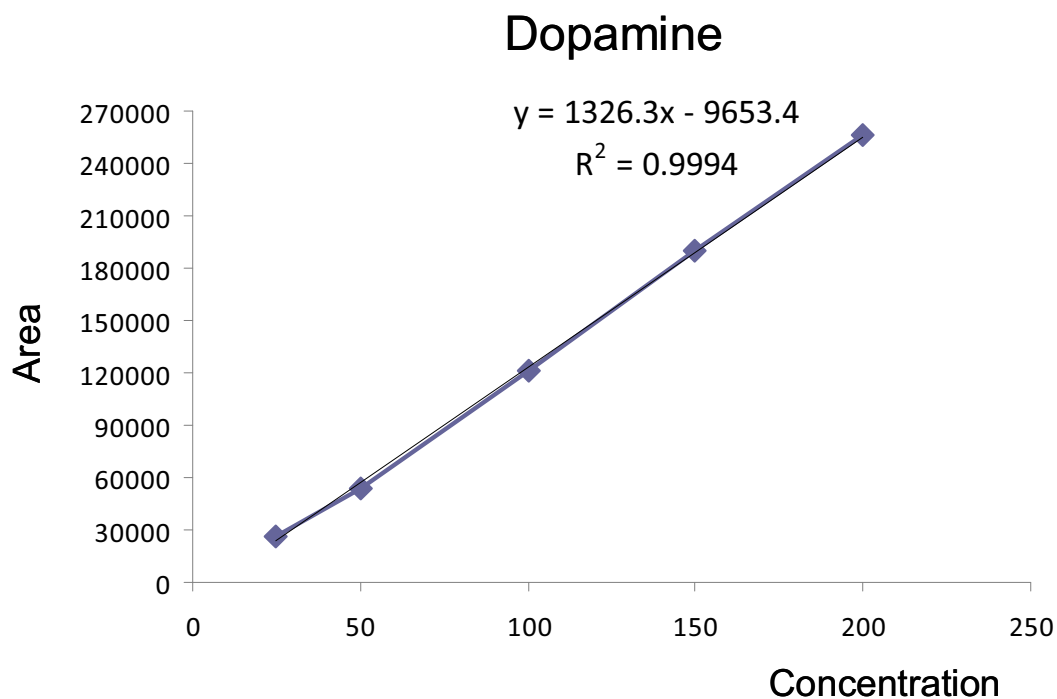
Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
3	Norepinephrine	6.482	211548	11433
4	Epinephrine	7.292	817879	43731
5	Dopamin	12.524	255519	7750
6	Serotonin	28.290	379459	10939
Totals			1664404	73852

รูปที่ 46 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น mix 5 ของสารมาตรฐานชนิดต่างๆคือ นอร์อิพิเนฟริน อิพิเนฟริน โดปามินและซีโรโทนิน ที่ความเข้มข้น 280, 600, 200, และ 160 นาโนกรัม/ มิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 47 กราฟเปรียบเทียบมาตรฐานของนอร์อิพิเนฟริน (บน) อิพิเนฟริน (ล่าง)



รูปที่ 48 กราฟเปรียบเทียบมาตรฐานของโดปามีน (บน) ซีโรโทนิน(ล่าง)

ตารางที่ 9 แสดง intraday variation (ค่า mean, SD, % CV) ของสารมาตรฐาน นอร์อิพิเนฟริน อีพินเนฟริน โดปามีนและซีโรโทนิน ที่ 3 ความเข้มข้นๆ ละ 6 ครั้ง ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน

Std.Nor conc. 35 ng/ml		Std.Nor conc. 140 ng/ml		Std.Nor conc. 280 ng/ml	
Injection no	conc.ng/ml	Injection no	conc.ng/ml	Injection no	conc.ng/ml
1	34.78	1	141.59	1	273.25
2	33.49	2	138.91	2	267.14
3	32.49	3	140.35	3	272.62
4	33.93	4	141.54	4	267.33
5	33.56	5	141.56	5	282.28
6	32.02	6	143.94	6	281.47
Mean	33.38	Mean	141.31	Mean	274.01
SD	0.9949	SD	1.6596	SD	6.6087
% CV	2.98	% CV	1.17	% CV	2.41

Std.Epi conc. 75 ng/ml		Std.Epi conc. 300 ng/ml		Std.Epi conc. 600 ng/ml	
Injection no	conc.ng/ml	Injection no	conc.ng/ml	Injection no	conc.ng/ml
1	74.26	1	294.23	1	572.45
2	73.25	2	290.87	2	552.94
3	72.43	3	293.05	3	579.69
4	73.01	4	296.40	4	564.62
5	72.44	5	295.24	5	592.29
6	70.87	6	297.66	6	586.59
Mean	72.71	Mean	294.57	Mean	574.76
SD	1.1264	SD	2.4275	SD	14.5324
% CV	1.55	% CV	0.82	% CV	2.53

Std.Dopa conc. 25 ng/ml		Std.Dopa conc. 100 ng/ml		Std.Dopa conc. 200 ng/ml	
Injection no	conc.ng/ml	Injection no	conc.ng/ml	Injection no	conc.ng/ml
1	29.26	1	93.30	1	169.81
2	25.91	2	91.13	2	181.90
3	26.39	3	103.90	3	170.90
4	27.37	4	104.04	4	191.00
5	26.08	5	100.84	5	196.82
6	28.20	6	102.33	6	173.92
Mean	27.20	Mean	99.26	Mean	180.72
SD	1.3307	SD	5.6212	SD	11.2075
% CV	4.89	% CV	5.66	% CV	6.20

Std.Sero conc. 20 ng/ml		Std.Sero conc. 80 ng/ml		Std.Sero conc. 160 ng/ml	
Injected	conc.ng/ml	Injection no	conc.ng/ml	Injection no	conc.ng/ml
1	21.95	1	67.44	1	187.68
2	20.66	2	68.68	2	184.13
3	19.92	3	69.71	3	189.66
4	20.58	4	67.50	4	186.32
5	19.91	5	85.17	5	192.35
6	19.19	6	72.17	6	192.34
Mean	20.37	Mean	71.78	Mean	188.75
SD	0.9400	SD	6.7879	SD	3.3205
% CV	4.61	% CV	9.46	% CV	1.76

ตารางที่ 10 แสดง interday variation (ค่า mean, SD, % CV) ของสารมาตรฐาน นอร์อิพิเนฟฟิน (Nor) อิพิเนฟฟิน (Epi) โดปามีน (Dopa) และซีโรโทนิน (Sero) 3 ความเข้มข้นในการวิเคราะห์ทั้ง 6 วัน

Std.Nor conc. 35 ng/ml		Std.Nor conc. 140 ng/ml		Std.Nor conc. 280 ng/ml	
Day	conc.ng/ml	Day	conc.ng/ml	Day	conc.ng/ml
1	36.38	1	146.92	1	272.53
2	33.19	2	140.13	2	268.04
3	32.39	3	140.46	3	291.35
4	31.81	4	139.75	4	270.33
5	33.62	5	138.19	5	291.95
6	30.17	6	137.85	6	269.18
Mean	32.93	Mean	140.55	Mean	277.23
SD	2.0756	SD	3.2946	SD	11.2702
% CV	6.30	% CV	2.34	% CV	4.07

Std.Epi conc. 75 ng/ml		Std.Epi conc. 300 ng/ml		Std.Epi conc. 600 ng/ml	
Day	conc.ng/ml	Day	conc.ng/ml	Day	conc.ng/ml
1	75.60	1	306.77	1	582.57
2	71.96	2	297.36	2	571.77
3	70.58	3	297.27	3	623.06
4	70.91	4	293.08	4	579.01
5	74.83	5	290.31	5	625.53
6	66.77	6	290.15	6	575.77
Mean	71.78	Mean	295.82	Mean	592.95
SD	3.2009	SD	6.2355	SD	24.5525
% CV	4.46	% CV	2.11	% CV	4.14

Std.Dopa conc. 25 ng/ml		Std.Dopa conc. 100 ng/ml		Std.Dopa conc. 200 ng/ml	
Day	conc.ng/ml	Day	conc.ng/ml	Day	conc.ng/ml
1	27.64	1	109.62	1	195.10
2	27.33	2	105.30	2	192.21
3	27.97	3	105.02	3	207.15
4	26.50	4	103.35	4	193.72
5	27.53	5	103.02	5	208.87
6	25.59	6	102.95	6	194.54
Mean	27.09	Mean	104.88	Mean	198.60
SD	0.8837	SD	2.5381	SD	7.3770
% CV	3.26	% CV	2.42	% CV	3.71

Std.Sero conc. 20 ng/ml		Std.Sero conc. 80 ng/ml		Std.Sero conc. 160 ng/ml	
Day	conc.ng/ml	Day	conc.ng/ml	Day	conc.ng/ml
1	20.06	1	82.28	1	190.94
2	18.91	2	82.90	2	187.34
3	19.13	3	81.51	3	204.77
4	18.97	4	82.24	4	189.37
5	19.78	5	80.87	5	204.89
6	17.89	6	81.44	6	189.77
Mean	19.12	Mean	81.87	Mean	194.51
SD	0.7626	SD	0.7338	SD	8.0759
% CV	3.99	% CV	0.90	% CV	4.15

8. ผลการวิเคราะห์ระดับสารสื่อประสาทนอร์อิพิเนฟฟิน อิพิเนฟฟิน โดปามีน และ ซีโรโทนิน ในสมองส่วนคอร์เท็กซ์

จากการวิเคราะห์ supernatant พบว่าระดับของสารสื่อประสาทชนิดโดปามีนและซีโรโทนินในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสมีระดับต่ำมากกว่าที่เครื่อง HPLC จะสามารถ detect พิกัดได้ (รูปที่ 49) ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์หาระดับสารสื่อประสาทจากสมองส่วนคอร์เท็กซ์แทน ซึ่งมีปริมาณของสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟฟิน อิพิเนฟฟิน โดปามีนและซีโรโทนิน ในปริมาณที่สามารถวัดได้ด้วยระบบวิเคราะห์ที่มีอยู่ ดังตัวอย่างแสดงในรูปที่ 50 และเนื่องจากระดับสารสื่อประสาทเหล่านี้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งส่วนฮิปโปแคมปัสและคอร์เท็กซ์ในหนูทดลองชุดที่ 1 อาจเนื่องมาจากเก็บตัวอย่างไว้นานเกินไป (นานเกิน 6 เดือน) ดังนั้นผลในส่วนนี้จึงมีแค่เฉพาะจากหนูชุดที่ 2 คือกลุ่ม control sham (n=4) กลุ่ม control A β (n=4) กลุ่ม A β +BN 0.5 (n=4) กลุ่ม A β +BN 5 (n=4) กลุ่ม A β +BN 10 (n=4) และ กลุ่ม A β +BN 40 (n=12) ซึ่งเมื่อนำค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีคของสารต่างๆ มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานและมิลลิกรัมโปรตีนของเนื้อสมอง พบว่ามีค่าเฉลี่ยของนอร์อิพิเนฟฟิน อิพิเนฟฟิน โดปามีนและซีโรโทนิน แสดงดังกราฟรูปที่ 51, และ 52 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการทดสอบทางสถิติ ไม่พบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$; one-way ANOVA)

Shimadzu CLASS-VP V6.14 SP1 Area % Report

Page 1 of 1

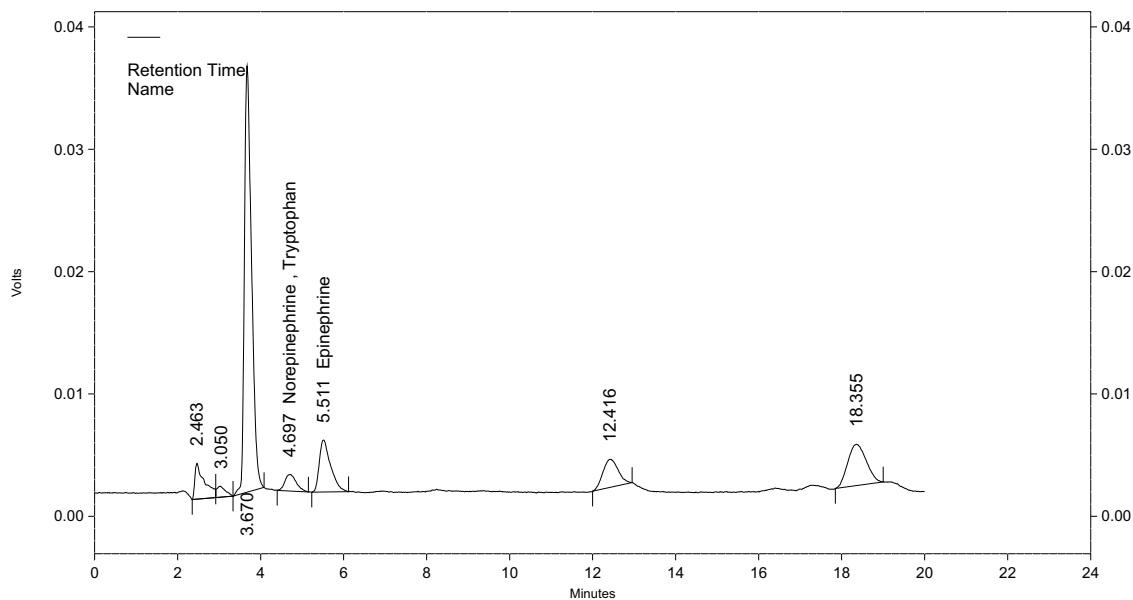
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Serotonin\Serotonin-3.met

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Serotonin\May 2010\Hippocampus\Hippocampus 1 - 001

User: System

Acquired: 5/6/2010 11:58:11 AM

Printed: 5/19/2010 1:47:36 PM



Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1		2.463	47328	2911
2		3.050	13057	863
3		3.670	416992	34714
4	Norepinephrine, Tryptophan	4.697	25819	1340
5	Epinephrine	5.511	80400	4236
6		12.416	58730	2290
7		18.355	105129	3374

Totals			747454	49728
--------	--	--	--------	-------

Shimadzu CLASS-VP V6.14 SP1 Area % Report

Page 1 of 1

รูปที่ 49 ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

Shimadzu CLASS-VP V6.14 SP1 Area % Report

Page 1 of 1

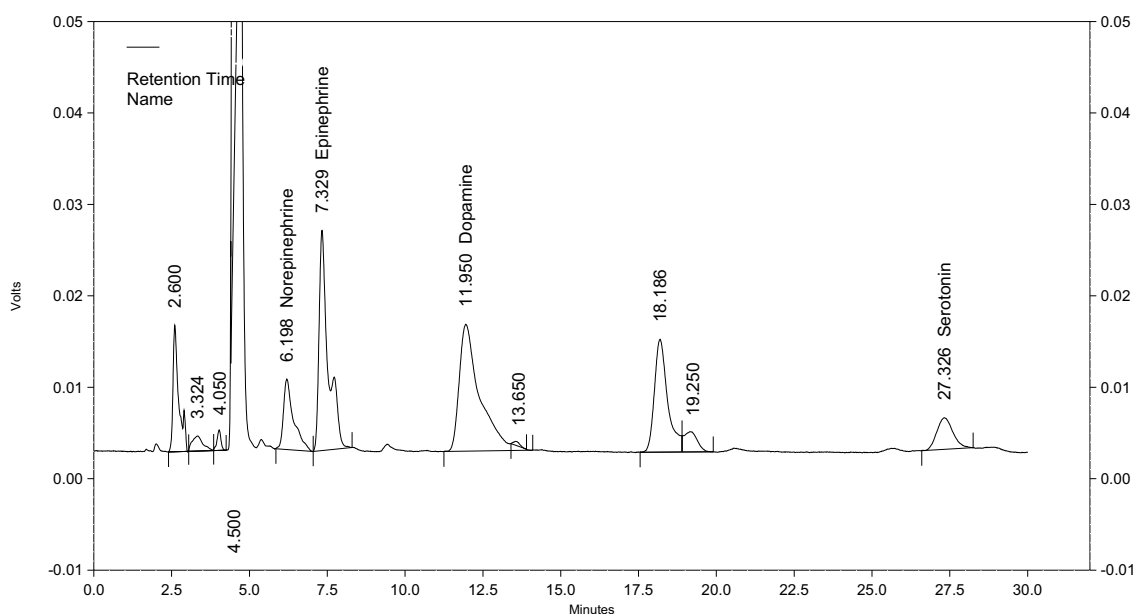
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Serotonin\Serotonin-3.met

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Serotonin\May 2010\Cortex\Cortex 30 - 001

User: System

Acquired: 5/26/2010 11:21:21 AM

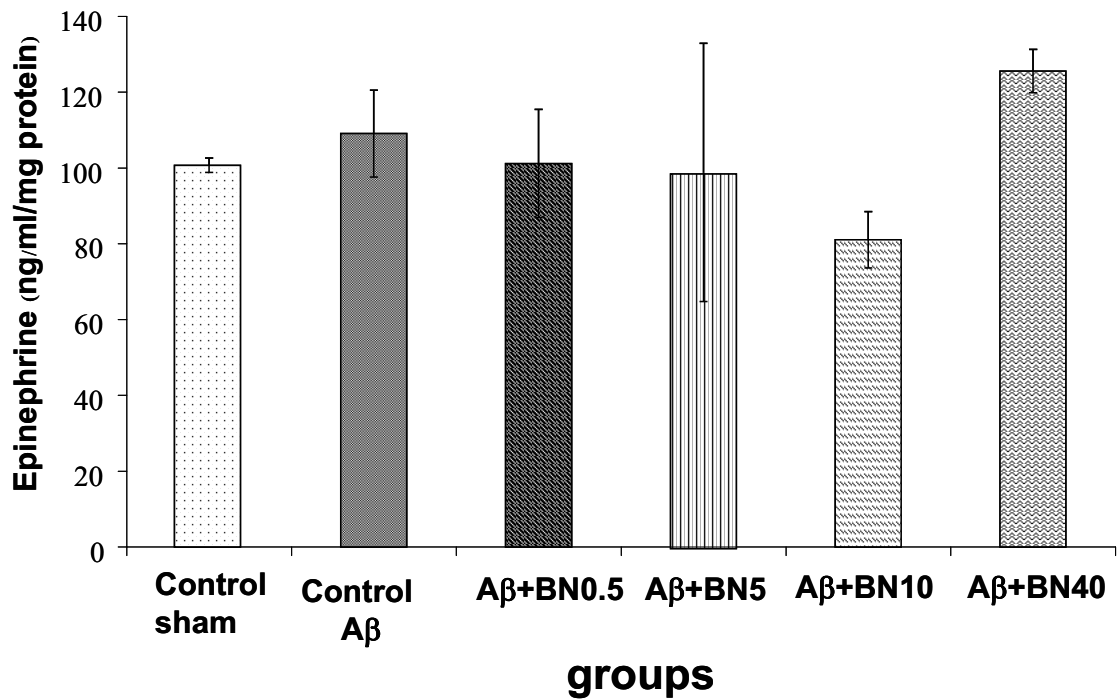
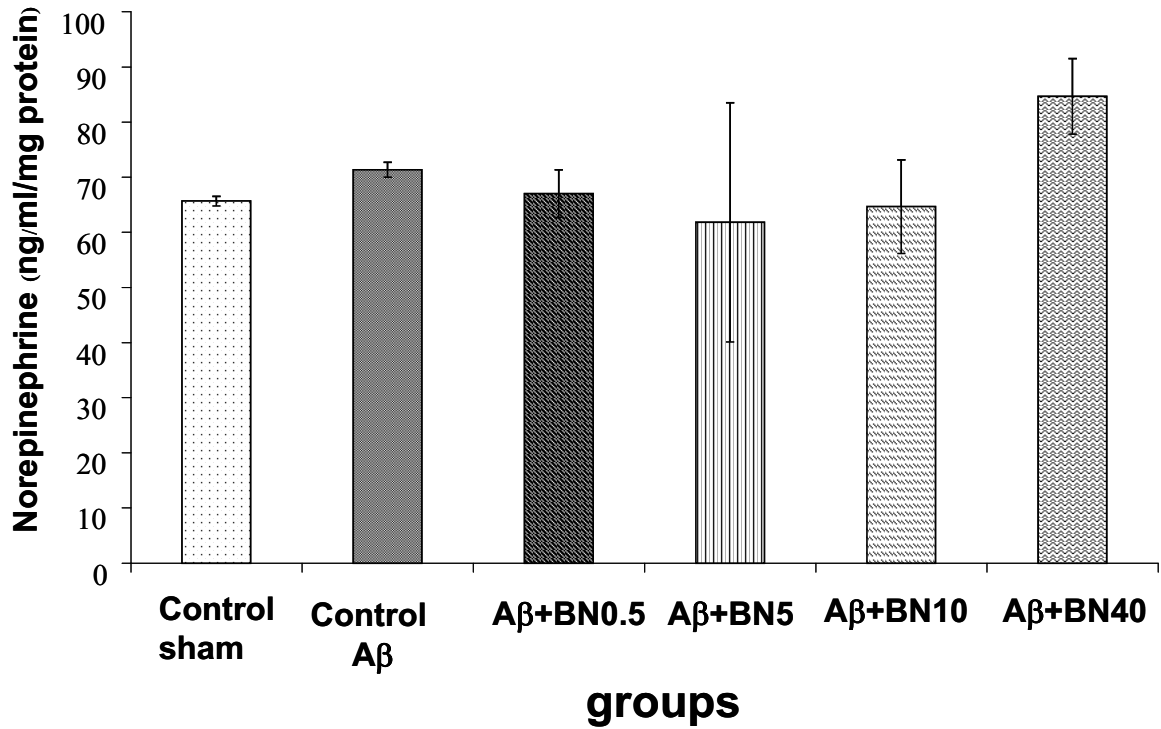
Printed: 6/8/2010 4:26:02 PM



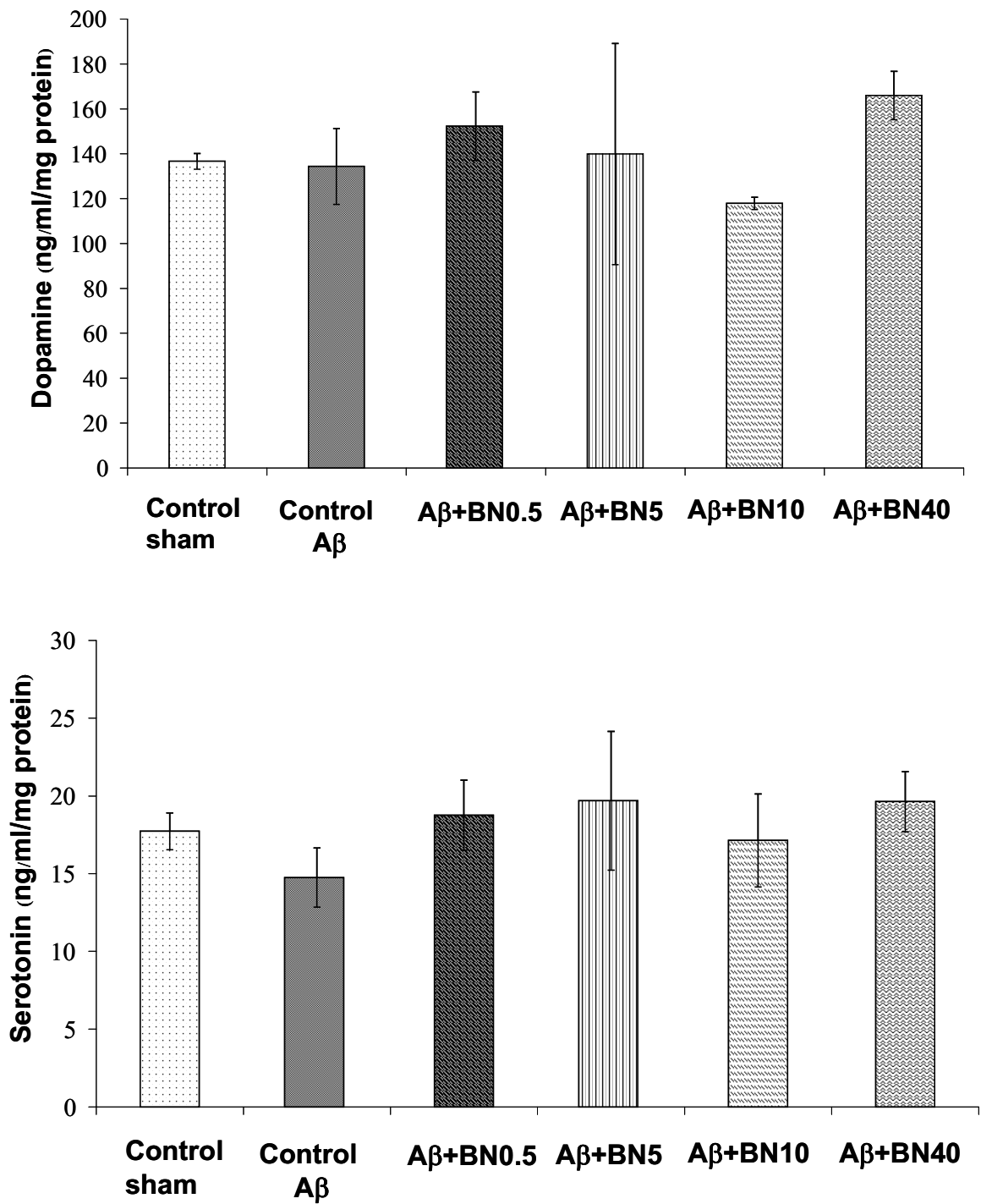
Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
5	Norepinephrine	6.198	173493	7454
6	Epinephrine	7.329	492817	23798
7	Dopamine	11.950	638870	13754
11	Serotonin	27.326	124008	3439
Totals			1429188	48445

รูปที่ 50 ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนคอร์เทกซ์



รูปที่ 51 ระดับของนอร์อิพิเนฟริน (กราฟบน) และอิพิเนฟริน (กราฟล่าง) ที่วัดได้จาก supernatant สมองส่วนคอร์เท็กซ์ของหนูกลุ่ม control sham กลุ่ม control A β กลุ่ม A β +BN 0.5 กลุ่ม A β +BN 5 กลุ่ม A β +BN10 และกลุ่ม A β +BN40 ซึ่งไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มแต่ละกลุ่ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$; one-way ANOVA)



รูปที่ 52 ระดับของโดปามีน (กราฟบน) และซีโรโทนิน (กราฟล่าง) ที่วัดได้จาก supernatant สมอง ส่วนคอร์เท็กซ์ของหนูกลุ่ม control sham กลุ่ม control A β กลุ่ม A β +BN 0.5 กลุ่ม A β +BN 5 กลุ่ม A β +BN10 และกลุ่ม A β +BN40 ซึ่งไม่พบว่ามีแตกต่างระหว่างกลุ่มแต่ละกลุ่ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p > 0.01; one-way ANOVA)

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม พบว่าหนูทดลองในกลุ่มควบคุมส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวที่ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นกลุ่มที่เหนียวทำให้เกิดความจำบกพร่องและได้รับกล้วยในขนาดสูงสุด 40 ก/กน้ำหนักตัว ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักต่ำกว่ากลุ่มอื่นซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าผลน้ำหนักที่ลดลงในหนูกลุ่มที่ได้รับกล้วยในปริมาณที่สูงนี้ เกี่ยวข้องกับการที่กล้วยมีเส้นใยที่สูง ประมาณ 2.4 เปอร์เซ็นต์ (Usha et al., 1989; Yin et al., 2008) และสอดคล้องกับคำแนะนำที่ว่า หากรับประทานกล้วยน้ำว้าสุก ทุกวันครั้งละ 2 – 4 ผล จะช่วยในการขับถ่ายและเป็นยาระบายได้

ถึงแม้ว่ากล้วยเป็นผลไม้ที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ โดยมีประมาณ 12% และอีก 5% เป็นแป้ง (Usha et al., 1984; Kumar and Sanwal, 1982; 1983) ซึ่งปริมาณของแป้งและน้ำตาลในกล้วยจะมีเพิ่มมากขึ้นเมื่อผลกล้วยสุกงอมมากขึ้น (Englyst et al., 1986) อย่างไรก็ตาม จากผลการตรวจระดับน้ำตาลในเลือดในงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า การให้กล้วยบดแก่หนูทดลองติดต่อกันเป็นเวลานาน 90 วันทีขนาด 0.5, 5 และ 10 ก/กน้ำหนักตัว ไม่พบว่ามีผลในการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเปรียบเทียบกับผลจากกลุ่มหนูที่ไม่ได้รับกล้วย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณของแป้งและน้ำตาลจากผลกล้วยหลังจากที่หนูได้รับประทาน ถูกใช้ไปในขบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายจนหมดและไม่มีการสะสมจนเกินปกติ แต่การบริโภคกล้วยที่สุกในปริมาณที่มากอาจเกิดผลเสียในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน (Hermansen et al., 1992)

จากผลการทดสอบพฤติกรรมการเคลื่อนไหวพบว่า การบริโภคกล้วยส่งผลให้มีการเคลื่อนไหวลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับกล้วย ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับสารทริปโตเฟน (tryptophan) ที่มีในกล้วย (Feighner et al., 1989; Ranzani and Sturion, 1998; Herraiz and Galisteo, 2002; Carey, 2003) ซึ่งทริปโตเฟนนี้สามารถเปลี่ยนไปเป็นเมลาโทนินในสมอง ทำให้มีกระตุ้นการนอนหลับ ทำให้ซึม และการเคลื่อนไหวลดลง (Redlin, 2001; Zhdanova et al., 2002) อย่างไรก็ตาม การได้รับกล้วยทุกวันในทุกขนาด 0.5, 5 และ 10 ก/ก น้ำหนักตัว ไม่ช่วยให้สามารถลดความวิตกกังวลได้ ซึ่งจากผลการทดสอบฤทธิ์ด้านความวิตกกังวลด้วยวิธี Elevated Plus Maze พบว่าไม่มีความแตกต่างในหนูแต่ละกลุ่มที่ได้รับกล้วยหรือไม่ได้รับกล้วย และเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนผ่าตัดหรือหลังผ่าตัด คือหนูยังแสดงพฤติกรรมการกลัวที่โล่งและกลัวความสูงเหมือนหนูปกติตามธรรมชาติทั่วไป เป็นที่ทราบกันว่าพฤติกรรมที่เกี่ยวกับการวิตกกังวล (anxiety) เกี่ยวข้องกับสมองหลายส่วน อาทิเช่น ระบบลิมบิก (limbic regions) ฮิปโปแคมปัส (hippocampus) อะมิกดาลา (amygdala) และส่วนบนของราเฟ นิวเคลียส (dorsal raphe nucleus) และเกี่ยวข้องกับหลายกลไก ไม่ว่าจะเป็นทางระบบสารสื่อประสาทเช่น กาบา (GABA) กลูตาเมต (glutamate) ซีโรโทนิน (serotonin) และ hypothalamic-pituitary-adrenal axis neuromodulators เป็นต้น (Walf and Frye,

2007) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์สารสื่อประสาทในสมองของหนูที่ถูกป้อนกลัยไซม์ไม่พบว่ามีปริมาณซีโรโทนินแตกต่างจากกลุ่มควบคุม จึงเป็นไปได้ว่ากลัยไซม์อาจไม่มีฤทธิ์เด่นชัดในการคลายความวิตกกังวล (anxiolytic property) เมื่อเทียบกับการให้ยา diazepam ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้ลดอาการวิตกกังวลในผู้ป่วย

จากผลการทดลองในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องคล้ายกับโรคอัลไซเมอร์โดยการฉีดสารละลาย $A\beta_{25-35}$ peptide ที่โพรงสมอง พบว่า ในหนูกลุ่มควบคุมความจำบกพร่องที่ถูกฉีดด้วย $A\beta_{25-35}$ peptide (control $A\beta$) มีความจำที่บกพร่องทั้งความจำเกี่ยวกับสถานที่ (spatial memory) เมื่อทดสอบด้วยวิธี Morris Water Maze โดยเฉพาะการดึงเอาข้อมูลเก่า/ความจำมาใช้ (retention/recall memory) ในช่วงทดสอบ probe trial โดยหนูจะใช้เวลาในการว่ายน้ำวนเวียนหาแท่นไปเรื่อยๆทั่วทุกโซน ซึ่งต่างจากหนูกลุ่มควบคุมปกติ (Control Sham) ซึ่งจะใช้เวลาว่ายน้ำวนหาแท่นอยู่ภายในโซนที่เคยมีแท่นมาก่อนมากกว่าโซนที่ไม่มีแท่น นอกจากนี้หนูกลุ่ม control $A\beta$ ยังแสดงความบกพร่องในการจดจำเกี่ยวกับวัตถุสิ่งของเมื่อทดสอบด้วยวิธี Novel Object Recognition คือใช้เวลาในการสำรวจวัตถุเก่ามากกว่าวัตถุใหม่ แสดงหนูมีความจำบกพร่องไม่สามารถจดจำได้ว่าสิ่งของไหนเป็นสิ่งที่เคยพบเห็นหรือสำรวจมาก่อน เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมความจำปกติซึ่งจะแสดงพฤติกรรมเหมือนหนูปกติทั่วไปคือจะจดจำได้ว่าสิ่งใดเคยเป็นสิ่งที่เคยพบเห็นมาก่อนแล้วและจะใช้เวลาส่วนใหญ่สำรวจวัตถุสิ่งของชิ้นใหม่มากกว่าสิ่งของเก่าที่เคยสำรวจแล้วอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดสอบพฤติกรรมในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง ด้วยการฉีด amyloid β_{25-35} เข้าในสมองและได้รับการป้อนกลัยไซม์ขนาดต่างๆ เป็นระยะเวลาติดต่อกันนาน 90 วัน พบว่าหนูความจำบกพร่องที่ได้รับกลัยไซม์ขนาดต่ำ 0.5 ก./กก. และขนาดกลาง 5 ก./กก. มีการจดจำเกี่ยวกับวัตถุสิ่งของ (object recognition) ดีมากกว่า หนูกลุ่มความจำบกพร่องที่ได้รับน้ำกลั่น (control $A\beta$) เนื่องจากพบว่ามีการใช้เวลาสำรวจวัตถุใหม่และวัตถุเก่าทั้งสองพอยกัน และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในหนูกลุ่มความจำบกพร่องควบคุมที่มีค่าระยะเวลาในการสำรวจวัตถุเก่ามากกว่าวัตถุใหม่ ในขณะที่หนูความจำบกพร่องที่ได้รับกลัยไซม์ในขนาดสูง 10 และ 40 ก./กก. มีแนวโน้มที่มีความจำใกล้เคียงปกติและพอๆ กับหนูปกติ คือมีการจดจำเกี่ยวกับวัตถุสิ่งของและความจำเกี่ยวกับสถานที่ ดีกว่าหนูกลุ่มความจำบกพร่องที่ได้รับน้ำกลั่น อย่างไรก็ตาม กลไกการปกป้องภาวะความจำบกพร่องของกลัยไซม์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ก็มีงานวิจัยในหลอดทดลองที่แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในกลัยไซม์ (Englberger et al., 2006a; 2006b; Tanaka et al., 2000; Sojo et al., 2000) สามารถยับยั้งภาวะความเป็นพิษของ PC12 cells จากผลของการได้รับ oxidative stress (Heo et al., 2008)

จากผลการวิเคราะห์ระดับของสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโน ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส พบว่า หนูควบคุมความจำบกพร่องมีค่าเฉลี่ยของระดับของแอสปาเตตและกลูตาเมต ต่ำกว่าในกลุ่ม หนูควบคุมปกติ ส่วนหนูความจำบกพร่องที่ได้รับกล้วยขนาดต่างๆ มีแนวโน้มของระดับ แอสปาเตต กลูตาเมตที่มากขึ้นตามขนาดของกล้วยที่หนูแต่ละกลุ่มได้รับมากขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในทางเพิ่มขึ้นของกลูตาเมตในระดับที่ไม่สูงมากจนผิดปกติ อาจบ่งบอกถึงผลดีในแง่ของพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ (Errico et al., 2009; Richter-Levin et al., 1995) เนื่องจากเป็นที่ทราบว่าการเกิดการเรียนรู้และความจำนั้น เกี่ยวข้องกับการที่มีการเพิ่มขึ้นของถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่เรียกว่า long term potentiation ภายในวงจรสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งใช้กลูตาเมตเป็นสารสื่อประสาทสำคัญในการถ่ายทอดสัญญาณประสาท (Teyler, 1987; Francis et al., 1993; Kandel et al., 2000) ส่วนแอสปาเตตก็จัดเป็นสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้นเช่นกันสามารถถูกกระตุ้นให้หลั่งออกมาได้ และจับกับตัวรับชนิดเดียวกับที่สารสื่อประสาทกลูตาเมตจับ สำหรับเซอรินที่จัดเป็นตัว modulator ช่วยในการทำงานของตัวรับชนิดกลูตาเมตทำงานได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของระดับสารสื่อประสาทแอสปาเตต กลูตาเมต ในหนูกลุ่มที่ได้รับกล้วยขนาดสูงนี้มีความสอดคล้องกับผลการทดสอบพฤติกรรม ที่พบว่า หนูความจำบกพร่องที่ได้รับกล้วยมีความจำที่เกี่ยวข้องสถานที่และการจดจำวัตถุสิ่งของดีขึ้น เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมความจำบกพร่อง (Control AB) ที่พบว่า มีระดับของสารสื่อประสาทกลุ่มดังกล่าวลดน้อยลงและมีความสามารถในการเรียนรู้และความจำบกพร่องเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมปกติ (Control Sham)

ในการทดลองนี้ พบว่ามีระดับของกลูตามีนเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม control AB ซึ่งเป็นไปได้ว่ามีการลดการใช้กลูตามีนในการสังเคราะห์เป็นกลูตาเมตในหนูกลุ่มดังกล่าว จึงทำให้ระดับกลูตามีนเหลือมากขึ้น (Procter et al., 1986; Smith et al., 1983) ในทางตรงกันข้ามระดับของกลูตามีนมีแนวโน้มลดลงในกลุ่มหนูความจำบกพร่องที่ได้รับกล้วยในขนาดที่สูงขึ้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าในหนูกลุ่มต่างๆ เหล่านี้มีการใช้กลูตามีนในการสังเคราะห์เป็นกลูตาเมต ซึ่งพบว่า มีระดับกลูตาเมตมากขึ้นเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มความจำบกพร่องที่ไม่ได้รับกล้วย

นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างของระดับเซอรินและไกลซีน ซึ่งเป็นเพียงสารที่ช่วยควบคุมการถ่ายทอดสัญญาณประสาทโดยใช้กลูตาเมตในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Duffy et al., 2008; Kandel et al., 2000; Mothet et al., 2006) เนื่องจากผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับกล้วยมีระดับเซอรินและไกลซีนใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าการรับประทานกล้วยไม่มีผลต่อสารสื่อประสาทชนิดนี้ในฮิปโปแคมปัส ส่วนระดับกาบาในสมองส่วนนี้ไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูแต่ละกลุ่ม ซึ่งให้เห็นว่าผลลดพฤติกรรมเคลื่อนไหวกว้างของกล้วยไม่น่าเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของกาบาในการยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาท ซึ่งการที่หนูเคลื่อนไหวลดลงหลังจากได้รับกล้วย อาจเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของสารชนิดอื่นในสมอง เช่น ทริปโตฟาน

จากการศึกษาปริมาณของสารสื่อประสาทกลุ่ม catecholamine ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ของหนูทดลองกลุ่มต่างๆ ร่วมกับพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ อาจสรุปได้ว่า ในภาวะที่ชักนำให้เกิดความจำบกพร่องโดยการฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides ที่โพรงสมอง ไม่ทำให้การหลั่งสารสื่อประสาทกลุ่มนี้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าหน้าที่หลักของสารสื่อประสาทพวกนี้เกี่ยวข้องกับระบบลิมบิกในเรื่องของแรงจูงใจ สติ การควบคุมอารมณ์ การนอนหลับ พฤติกรรมการกิน และพฤติกรรมทางเพศ (Kandel et al., 2000) จากการสังเกตของผู้วิจัยพบว่าหลังจากที่หนูได้รับการป้องกันด้วย สักพักหนูจะลดพฤติกรรมการเคลื่อนไหวลง ไม่ตื่นตัวและจะนอนหลับเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งได้มีรายงานวิจัยในอดีตที่ผ่านมาซึ่งระบุว่าผลกล้วยมีทริปโตเฟน (tryptophan) และซีโรโทนินในปริมาณที่สูง (Waalkes et al., 1958; Connell et al., 1960; Kimura, 1968) ทั้งซีโรโทนินและทริปโตเฟนที่ได้จากการรับประทานกล้วยจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อไปเลี้ยงร่างกาย แต่เนื่องจากซีโรโทนินไม่สามารถผ่านโครงสร้างของ blood brain barrier ได้เหมือนกับทริปโตเฟน ดังนั้นซีโรโทนิน จากกล้วยจึงอาจมีผลช่วยระบบอื่นๆ ของร่างกาย อาทิเช่น ช่วยระบบทางเดินอาหาร ทำให้ระบบขับถ่ายอุจจาระเป็นไปอย่างปกติ (Connell et al., 1960) และรักษาอาการท้องผูก (Collier, 1958) สำหรับทริปโตเฟน จัดเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย และเป็นสารตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์สารสื่อประสาทกลุ่ม catecholamine ซึ่งรวมทั้งซีโรโทนิน เมื่อถูกดูดซึมผ่าน blood brain barrier สู่เซลล์ประสาทจะถูกเปลี่ยนให้เป็นซีโรโทนินที่ raphe nuclei และต่อไพเนียล (pineal gland) ทำหน้าที่ควบคุมการนอนหลับ (Pardridge and Oldendorf, 1975; Kandel et al., 2000).

จากผลการทดลองนี้ อาจสรุปได้ว่าการได้รับกล้วยที่ขนาดสูง มีผลต่อการฟื้นฟูภาวะความจำบกพร่องได้ โดยอาจไปเพิ่มระดับของสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนโดยเฉพาะ แอสปาเตต และกลูตาเมต ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ช่วยปกป้องและฟื้นฟูความจำเกิดจากผลของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่มากในกล้วยน้ำว้า (Englberger et al., 2006a; 2006b; Tanaka et al., 2000; Sojo et al., 2000) หรืออาจเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายสารสื่อประสาทชนิด acetylcholine ในระบบประสาทโคลิเนอร์จิก (Bittner, 2009; Nieoullon, 2010) ซึ่งต้องทำการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

บรรณานุกรม

1. Allen IC, Grieve A, Griffiths R (1986) Differential changes in the content of amino acid neurotransmitters in discrete regions of the rat brain prior to the onset and during the course of homocysteine-induced seizures. *J Neurochem* 46:1582-1592.
2. Arvanitoyannis IS, Mavromatis A (2009) Banana cultivars, cultivation practices, and physicochemical properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49:113-135.
3. Bianchi, L. et al. (2003). Investigation on acetylcholine, aspartate, glutamate and GABA extracellular levels from ventral hippocampus during repeated exploratory activity in the rat. *Neurochemical Research*, 28, 565-73.
4. Bittner DM (2009) Combination therapy of acetylcholinesterase inhibitor and vitamin E in Alzheimer disease. *J Clin Psychopharmacol* 29:511-513.
5. Borges AA, Borges-Perez A, Fernandez-Falcon M (2003) Effect of menadione sodium bisulfite, an inducer of plant defenses, on the dynamic of banana phytoalexin accumulation during pathogenesis. *J Agric Food Chem* 51:5326-5328.
6. Carey P.B. (2003) Bananas. World Natural Health Organization. Burlington, WA 98233 USA (<http://www.wnho.net/bananas.htm>)
7. Collingridge GL, Lester RA (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41:143-210.
8. Collier, H. O. J. (1958). 5-Hydroxytryptamine, p. 18, G. P. Lewis (edit), Pergamon Press, London.
9. Connell A. M., Rowlands E. N., and Wilcox P. B. (1960) Serotonin, Bananas, and Diarrhoea. *Gut* 1(1): 44-47.
10. Dhanabal SP, Sureshkumar M, Ramanathan M, Suresh B (2005) Hypoglycemic effect of ethanolic extract of *Musa sapientum* on alloxan induced diabetes mellitus in rats and its relation with antioxidant potential. *J Herb Pharmacother* 5:7-19.
11. Duffy S, Labrie V, Roder JC (2008) D-serine augments NMDA-NR2B receptor-dependent hippocampal long-term depression and spatial reversal learning. *Neuropsychopharmacology* 33:1004-1018.
12. Englberger L, Schierle J, Aalbersberg W, Hofmann P, Humphries J, Huang A, Lorens A, Levendusky A, Daniells J, Marks GC, Fitzgerald MH (2006b) Carotenoid and vitamin

- content of Karat and other Micronesian banana cultivars. *Int J Food Sci Nutr* 57:399-418.
13. Englberger L, Wills RB, Blades B, Dufficy L, Daniells JW, Coyne T (2006a) Carotenoid content and flesh color of selected banana cultivars growing in Australia. *Food Nutr Bull* 27:281-291.
 14. Englyst HN, Cummings JH (1986) Digestion of the carbohydrates of banana (*Musa paradisiaca sapientum*) in the human small intestine. *Am J Clin Nutr* 44:42-50.
 15. Errico F, Napolitano F, Nistico R, Centonze D, Usiello A (2009) D-aspartate: an atypical amino acid with neuromodulatory activity in mammals. *Rev Neurosci* 20:429-440.
 16. Francis PT, Sims NR, Procter AW, Bowen DM (1993) Cortical pyramidal neurone loss may cause glutamatergic hypoactivity and cognitive impairment in Alzheimer's disease: investigative and therapeutic perspectives. *J Neurochem* 60:1589-1604.
 17. Gramsbergen JB, Mountjoy CQ, Rossor MN, Reynolds GP, Roth M, Korf J (1987) A correlative study on hippocampal cation shifts and amino acids and clinico-pathological data in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 8:487-494.
 18. Harris EW, Stevens DR, Cotman CW (1987) Hippocampal cells primed with quisqualate are depolarized by AP4 and AP6, ligands for a putative glutamate uptake site. *Brain Res* 418:361-365.
 19. Hermansen K, Rasmussen O, Gregersen S, Larsen S (1992) Influence of ripeness of banana on the blood glucose and insulin response in type 2 diabetic subjects. *Diabet Med* 9:739-743.
 20. Herraiz T, Galisteo J (2002) Identification and occurrence of the novel alkaloid pentahydroxypentyl-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid as a tryptophan glycoconjugate in fruit juices and jams. *J Agric Food Chem* 50:4690-4695.
 21. Hertz L and Zeilke (2004) Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trend in Neurosciences*. 27: 735-743.
 22. Hoge J, Kesner RP. Role of CA3 and CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;88:225–231.
 23. Horigome T, Sakaguchi E, Kishimoto C (1992) Hypocholesterolaemic effect of banana (*Musa sapientum* L. var. *Cavendishii*) pulp in the rat fed on a cholesterol-containing diet. *Br J Nutr* 68:231-244.

24. Heo HJ, Choi SJ, Choi SG, Shin DH, Lee JM, Lee CY (2008) Effects of banana, orange, and apple on oxidative stress-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J Food Sci* 73:H28-32.
25. Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR (1987) Alzheimer's disease: glutamate depletion in the hippocampal perforant pathway zone. *Ann Neurol* 22:37-40.
26. Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenchom K, Yuyaem T, Thongnoi W (2003) Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J Ethnopharmacol* 89:261-264.
27. Jain SR (1969) A note on the chemical study of the hypoglycaemic substance from *Musa Sapientum*, L. *Planta Med* 17:99.
28. Kanazawa K, Sakakibara H (2000) High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish banana. *J Agric Food Chem* 48:844-848.
29. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM 2000. *Principles of Neural Science*, 4th ed. McGraw-Hill, New York.
30. Kimura M. (1968) Fluorescence histochemical study on serotonin and catecholamine in some plants. *The Japanese Journal of Pharmacology* 18(2): 162-168.
31. Krishnan K, Vijayalakshmi NR (2005) Alterations in lipids & lipid peroxidation in rats fed with flavonoid rich fraction of banana (*Musa paradisiaca*) from high background radiation area. *Indian J Med Res* 122:540-546.
32. Kumar A, Sanwal GG (1982) Purification and physicochemical properties of starch phosphorylase from young banana leaves. *Biochemistry* 21:4152-4159.
33. Kumar A, Sanwal GG (1983) Starch phosphorylase from mature banana (*Musa paradisiaca*) leaves: Part I--Kinetics & inhibition studies at optimum pH. *Indian J Biochem Biophys* 20:280-284.
34. Lindroth, P. & Mopper, K. (1979). High Performance Liquid Chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with O-Phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry*, 51, 1667-1674.
35. Marshall PB (1959) Catechols and tryptamines in the "matoke" banana (*Musa paradisiaca*). *J Pharm Pharmacol* 11:639.
36. Madepalli K. Lakshmana and Trichur R. (1997) AN Isocratic Assay for Norepinephrine, Dopamine, and 5-Hydroxytryptamine Using Their Native Fluorescence

- by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection in Discrete Brain Areas of Rat. *Analytical Biochemistry* 246: 166-170
37. McEntee WJ and Crook TH (1993) Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology* 111(4): 391-401.
 38. Morris, R. G. (1984) "Development of a Water-Maze Procedure for Studying Spatial Learning in Rat," *J. Neurosci Methods*, Vol. 11, No. 1, pp. 47-60.
 39. Mothet JP, Rouaud E, Sinet PM, Potier B, Jouvenceau A, Dutar P, Videau C, Epelbaum J, Billard JM (2006) A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell* 5:267-274.
 40. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ (2007) Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14:289-300.
 41. Mumby DG. Perspectives on Object-Recognition Memory Following Hippocampal Damage: Lessons from Studies in Rats. *Behav Brain Res*, Vol. 127, No. 1, pp. 159-181, 2001.
 42. Nieoullon A (2010) Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: further comments on their mechanisms of action and therapeutic consequences. *Psychol Neuropsychiatr Vieil* 8:123-131.
 43. Nilsson OG, Shapiro ML, Gage FH, Olton DS, Bjorklund A (1987) Spatial learning and memory following fimbria-fornix transection and grafting of fetal septal neurons to the hippocampus. *Exp Brain Res* 67:195-215.
 44. Nitsch C, Schmude B, Haug P (1983) Alterations in the content of amino acid neurotransmitters before the onset and during the course of methoxypyridoxine-induced seizures in individual rabbit brain regions. *J Neurochem* 40:1571-1580.
 45. Odink J, Korthals H, Knijff JH (1988) Simultaneous determination of the major acidic metabolites of catecholamines and serotonin in urine by liquid chromatography with electrochemical detection after a one-step sample clean-up on Sephadex G-10; influence of vanilla and banana ingestion. *J Chromatogr* 424:273-283.
 46. Pardridge WM, Oldendorf WH (1975) Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. *Biochem. Biophys. Acta* 401 (1): 128-36.

47. Pari L, Maheswari JU (1999) Hypoglycaemic effect of *Musa sapientum* L. in alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 68:321-325.
48. Paxinos and C. Watson (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Elsevier Inc., London, UK.
49. Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. & Briley, M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
50. Perez-Perez EM, Rodriguez-Malaver AJ, Padilla N, Medina-Ramirez G, Davila J (2006) Antioxidant capacity of crude extracts from clones of banana and plantain species. *J Med Food* 9:517-523.
51. Procter AW, Palmer AM, Stratmann GC, Bowen DM. (1986) Glutamate/Aspartate-Releasing Neurons in Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 314(26):1711-2.
52. Ranzani MR, Sturion GL (1998) [Amino acid composition evaluation of *Pleurotus* spp. cultivated in banana leaves]. *Arch Latinoam Nutr* 48:339-348.
53. Redlin U (2001) Neural basis and biological function of masking by light in mammals: suppression of melatonin and locomotor activity. *Chronobiol Int* 18:737-758.
54. Richter-Levin G, Canevari L, Bliss TV (1995) Long-term potentiation and glutamate release in the dentate gyrus: links to spatial learning. *Behav Brain Res* 66:37-40.
55. Riggan RM, McCarthy MJ, Kissinger PT (1976) Identification of salsolinol as a major dopamine metabolite in the banana. *J Agric Food Chem* 24:189-191.
56. Schaeffer EL, Gattaz WF (2008) Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacology (Berl)* 198:1-27.
57. Smith CC, Bowen DM, Sims NR, Neary D, Davison AN. (1983) Amino acid release from biopsy samples of temporal neocortex from patients with Alzheimer's disease. *Brain Res*. 264(1):138-41.
58. Snyder SH, and Kim PM (2000) D-Amino acids as putative neurotransmitters: Focus on D-Serine. *Neurochemical Research*, 25: 553-566.
59. Sojo MM, Nunez-Delicado E, Garcia-Carmona F, Sanchez-Ferrer A (1999) Cyclodextrins as activator and inhibitor of latent banana pulp polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 47:518-523.

60. Sojo MM, Nunez-Delicado E, Sanchez-Ferrer A, Garcia-Carmona F (2000) Oxidation of salsolinol by banana pulp polyphenol oxidase and its kinetic synergism with dopamine. *J Agric Food Chem* 48:5543-5547.
61. Subagio A, Morita N, Sawada S (1996) Carotenoids and their fatty-acid esters in banana peel. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 42:553-566.
62. Tanaka T, Kondou K, Kouno I (2000) Oxidation and epimerization of epigallocatechin in banana fruits. *Phytochemistry* 53:311-316.
63. Teyler TJ (1987) Long-term potentiation and memory. *Int J Neurol* 21-22:163-171.
64. Tohgi H, Abe T, Takahashi S, Kimura M (1992) A selective reduction of excitatory amino acids in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer type dementia compared with vascular dementia of the Binswanger type. *Neurosci Lett* 141:5-8.
65. Usha V, Vijayammal PL, Kurup PA (1989) Effect of dietary fiber from banana (*Musa paradisiaca*) on metabolism of carbohydrates in rats fed cholesterol free diet. *Indian J Exp Biol* 27:445-449.
66. Vettorazzi G (1974) 5-hydroxytryptamine content of bananas and banana products. *Food Cosmet Toxicol* 12:107-113.
67. Vijayakumar S, Presannakumar G, Vijayalakshmi NR (2008) Antioxidant activity of banana flavonoids. *Fitoterapia* 79:279-282.
68. Waalkes TP, Sjoerdsma A, Creveling CR, Weissbach H, Udenfriend S (1958) Serotonin, Norepinephrine, and Related Compounds in Bananas. *Science* 127 (3299), 648-650.
69. Xiaoqin Z, Zhengli L, Changgeng Z, Xiaojing W, Li L (2005) Changes in behavior and amino acid neurotransmitters in the brain of rats with seizure induced by IL-1 β or IL-6. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 25:236-239.
70. Yang CP, Fujita S, Ashrafuzzaman M, Nakamura N, Hayashi N (2000) Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J Agric Food Chem* 48:2732-2735.
71. Yin X, Quan J, Kanazawa T (2008) Banana prevents plasma oxidative stress in healthy individuals. *Plant Foods Hum Nutr* 63:71-76.
72. Zhdanova IV, Geiger DA, Schwagerl AL, Leclair OU, Killiany R, Taylor JA, Rosene DL, Moss MB, Madras BK (2002) Melatonin promotes sleep in three species of diurnal nonhuman primates. *Physiol Behav* 75:523-529.



เอกสารรับรองโครงการวิจัยในสัตว์ทดลอง
คณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อโครงการ การทดสอบฤทธิ์ของกล้วยในการฟื้นฟูภาวะความจำบกพร่องและฤทธิ์ด้านความวิตกกังวลในหนูแรท
 Effects of banana on the restoration of memory impairment and anti-anxiety in rats

ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร.พรนรินทร์ เทพวราพฤกษ์

เลขที่โครงการ/รหัส 52 04 0003

สังกัดหน่วยงาน/คณะ วิทยาศาสตร์การแพทย์

การรับรอง ขอรับรองโครงการวิจัยดังกล่าวข้างบนนี้ ได้ผ่านการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำเดือน มีนาคม 2552

ลงนาม

h. n

(ศาสตราจารย์พิเศษ ดร.กาญจนา เจริญศิริ)

ประธานคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร