



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ "ฤทธิ์ของสารสกัดจากผลมะปรางและ
หมากเม่าต่อภาวะความจำบกพร่องและความซึมเศร้า
และการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมี"

โดย นางสาวดี ดาวดี และ คณะ

พฤศจิกายน 2555

สัญญาเลขที่ RDG5420051

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ "ฤทธิ์ของสารสกัดจากผลมะปรางและ หมากเม่าต่อภาวะความจำบกพร่องและความซึมเศร้า และการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมี"

คณะผู้วิจัย

- นางสุภาวดี ดาวดี
- นางสาวจันทนา บุญยรัตน์
- นางเยาวเรศ ชูลิขิต

สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานฉบับนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัย
ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย
และขอขอบคุณบุคลากรที่ดำเนินงานในสำนักประสานงานวิจัยและพัฒนาสมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิตทุก
ท่านที่ช่วยประสานงานตลอดจนกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำจนกระทั่งงานวิจัยได้
สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
executive summary	1
บทคัดย่อ	4
Abstract	6
บทนำ	8
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	13
วิธีการศึกษา	
1. การเตรียมสารสกัดหยาบ	14
2. การศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันและฟื้นฟูความจำเสื่อม	14
3. การศึกษาฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้า	18
4. การวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี	27
ผลการศึกษา	
1. การเตรียมสารสกัดหยาบ	34
2. การศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันและฟื้นฟูความจำเสื่อม	35
3. การศึกษาฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้า	46
4. การวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี	55
สรุปและวิจารณ์	57
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	
บทความสำหรับการเผยแพร่	64
กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์	66
ตารางเปรียบเทียบ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง	69
ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง	70

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 อุปกรณ์ modified Y-maze	18
รูปที่ 2 Tail suspension apparatus	19
รูปที่ 3 Forced swimming test	21
รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานทองแดง	28
รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเหล็ก	29
รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานสังกะสี	29
รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานลิเทียม	30
รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานตะกั่ว	30
รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแคลเซียม	31
รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแมกนีเซียม	31
รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม	32
รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม	32
รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน β -carotene	33
รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน β -carotene โดย HPLC	34
รูปที่ 15 ผลของ trolox ในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS assay	35
รูปที่ 16 ผลของสารสกัดหมากเฒ่าและมะปรางในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS assay	36
รูปที่ 17 ผลของสารมาตรฐาน tacrine ต่อการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส	37
รูปที่ 18 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด 4 ชนิด	38
รูปที่ 19 ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท	39
รูปที่ 20 ผลของ beta amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ C6	40
รูปที่ 21 ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท จาก beta amyloid	41
รูปที่ 22 ผลของสารสกัดหมากเฒ่าและมะปรางในชั้น Ethanol ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพ การเรียนรู้และความจำโดยวิธี Water maze test	42
รูปที่ 23 กราฟแสดงเวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการหาแผ่นรองในช่วงการฝึกหนูให้ว่ายน้ำ	43
รูปที่ 24 ผลของ Tacrine ต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำในการทดสอบ Morris water maze	44
รูปที่ 25 ผลของสารสกัดหมากเฒ่า และ มะปรางในชั้น Ethanol ต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้ และความจำในการทดสอบ Morris water maze	44
รูปที่ 26 ผลของสารสกัดหมากเฒ่า และ มะปรางในชั้น Ethanol ต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้ และความจำในการทดสอบด้วย Modified Y-Maze	45

รูปที่ 27	ผลของมะปรางและหมากเฒ่าต่อค่า Immobility time ของหนูเมาส์ ในแบบทดสอบ Tail suspension test	47
รูปที่ 28	ผลของมะปรางและหมากเฒ่าต่อค่า Immobility time ของหนูเมาส์ ในแบบทดสอบ Forced swimming test	48
รูปที่ 29	ผลของมะปรางและหมากเฒ่าต่อ locomotor activity ของหนูเมาส์ในแบบทดสอบ Y maze test	49
รูปที่ 30	ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าต่อการบริโภคน้ำตาลซูโครสในหนูเมาส์ ที่หนูเหนียวทำให้เกิดภาวะซึมเศร้าภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน	50
รูปที่ 31	ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าต่อค่า immobility time ในแบบทดสอบ tail suspension test ในหนูเมาส์ที่หนูเหนียวทำให้เกิดภาวะซึมเศร้าภายใต้ สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน	51
รูปที่ 32	ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าต่อค่า immobility time ในแบบทดสอบ forced swimming test	52
รูปที่ 33	กราฟมาตรฐานของสารละลาย malondialdehyde	52
รูปที่ 34	กราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin	53
รูปที่ 35	ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าต่อการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในหนูเมาส์ที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน	54
รูปที่ 36	ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าต่อการแสดงออกของยีน BDNF และ CREB	55

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงสภาวะที่ใช้ในการให้สารทดสอบในหนูแต่ละกลุ่ม	17
ตารางที่ 2 แสดงสภาวะในการเลี้ยงหนูในการทดสอบ Unpredictable chronic mild stress	22
ตารางที่ 3 แสดงสภาวะในการให้ยาที่แตกต่างกันในหนูแต่ละกลุ่มของการทดสอบ	23
ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ BSA	25
ตารางที่ 5 Summary of the primer pair	26
ตารางที่ 6 สภาวะของเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer	27
ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฝ้าต่อการยับยั้งเอนไซม์ อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส	37
ตารางที่ 8 แสดงปริมาณแร่ธาตุแต่ละชนิดที่ตรวจพบในสารสกัดจากผลมะพร้าวและ หมากเฝ้า	56
ตารางที่ 9 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและ β -carotene ในสารสกัดผลมะพร้าวและ หมากเฝ้าจากส่วนของน้ำคั้นและ 95%ethanol	57

สัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid
CAN	acetonitrile
APP	Amyloid precursor protein
ATCI	Acetylthiocholine iodide
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BSA	Bovine serum albumin
CREB	cAMP response element-binding
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
FST	forced swimming test
HPLC	High performance liquid chromatography
ICR	Imprinting Control Region
IC ₅₀	Inhibition concentration at 50%
M-MLV	murine leukemia viruse
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
S.E.M.	standard error of measurement or mean
THF	tetrahydrofuran
TST	tail suspension test
UCMS	Unpredictable chronic mild stress

โครงการ "ฤทธิ์ของสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฝ้ายับยั้งการ
วิเคราะห์ห้องปฏิบัติการเคมี"
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ส่วนที่ 1 ข้อมูลโครงการ

ชื่อผู้รับทุน รศ.ดร.สุภาวดี ดาวดี

โครงการเริ่มเมื่อวันที่ 1 มิถุนายน 2554 รวมเวลาที่ทำวิจัยทั้งสิ้น 12 เดือน

รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 1 ในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน 2554 ถึงวันที่ 30 พฤศจิกายน 2554

ร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ ในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน 2554 ถึงวันที่ 31 พฤษภาคม 2555 (ขอขยายเวลาถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2555)

รายงานฉบับสมบูรณ์ วันที่ 20 พฤศจิกายน 2555

ส่วนที่ 2 รายงานเนื้อหา

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive summary)

จากการศึกษาพบว่าปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างออกมามากกว่าปกติในร่างกายมีผลเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดพยาธิสภาพต่างๆในร่างกาย เช่นภาวะสมองขาดเลือด ภาวะเส้นเลือดในสมองตีบตันหรือแตก ภาวะการอักเสบ และ ภาวะช็อกจากการติดเชื้อ รวมถึงโรคทางระบบประสาทเช่นอัลไซเมอร์ พาร์กินสัน และ โรคซึมเศร้า แต่สาเหตุต่างๆเหล่านี้จะสามารถป้องกันได้ จากข้อมูลงานวิจัยและระบาดวิทยา พบว่า การบริโภคผักผลไม้เป็นประจำสามารถลดอัตราเสี่ยงและเพิ่มอัตราการป้องกันการเกิดโรคเหล่านี้ได้ ซึ่งผลดังกล่าวมาจากมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประเภทวิตามินซี เบต้า-แคโรทีน แคโรทีนอยด์ รวมทั้งสารกลุ่มโพลีฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ ฟีนิลโพรพานอยด์ เป็นต้น โดยในปัจจุบันพบว่าสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ จากการสืบค้นข้อมูลพบว่ามะปรางและหมากเฝ้ายับยั้งเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลาย มีองค์ประกอบทางเคมีประเภทโพลีฟีนอลิกหลายชนิด ซึ่งจากการทดสอบเบื้องต้น พบว่าสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฝ้ายับยั้งแสดงฤทธิ์ต้าน lipid-peroxidation ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีความเชื่อมโยงกับภาวะผิดปกติในร่างกายดังที่ได้กล่าวไปแล้ว จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง หากได้มีการศึกษาค้นคว้าถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของมะปรางและหมากเฝ้ายับยั้งอย่างเป็นระบบในเชิงวิทยาศาสตร์ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น พบว่าสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฝ้ายับยั้งแสดงศักยภาพที่ดี ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ คณะนักวิจัยจึงเล็งเห็นว่าควรมีการวิจัยต่อเนื่องถึงผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของมะปรางและหมากเฝ้ายับยั้ง โดยมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ต่อโรคทางระบบประสาท เช่นฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท ผลในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อม และ ผลการต้านภาวะซึมเศร้า นอกจากนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางโภชนาการมากยิ่งขึ้น ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์และแร่ธาตุที่เป็นสารอาหารรอง หรือ Trace elementsที่ยังพบว่ามีการศึกษาวิจัยไม่ครอบคลุมและครบถ้วนร่วมด้วย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความเชื่อมโยงระหว่างปริมาณ Trace elements หรือ แคโรทีนอยด์และฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ

จากผลการศึกษาของสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฝ้ายับยั้ง 4 กลุ่มคือ น้ำคั้นจากผลหมากเฝ้ายับยั้ง, สารสกัดหมากเฝ้ายับยั้งด้วย Ethanol, น้ำคั้นจากผลมะปราง และ สารสกัดผลมะปรางด้วย Ethanol ทั้งใน *In Vitro* cell culture และ *In Vivo* พบว่า สารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฝ้ายับยั้งทั้ง 4 กลุ่มมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูล

อิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS assay และจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ดีในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาททั้งจากภาวะ oxidative stress ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย hydrogen peroxide และจาก beta amyloid โดยสารที่สกัดด้วย ethanol มีฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทได้ดีกว่าน้ำคั้น และเมื่อนำสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในชั้น Ethanol มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพและฤทธิ์ในการป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ในแบบจำลองสัตว์ทดลอง Morris water maze test และ Modified Y-maze test พบว่าสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในขนาด 250 $\mu\text{g/kg/day}$ ที่ให้ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 14 วัน มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำในหนูปกติ และสามารถป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ได้ โดยมีผลทั้งความจำระยะสั้น (spatial short-term memory) และความจำระยะยาว (spatial long term memory) สำหรับฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้า เมื่อนำสารสกัดชั้นเอทานอลของมะปรางและหมากเฒ่าไปศึกษาในแบบจำลองหนูไม่ชี้ที่ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะซึมเศร้าจากการเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน (unpredictable chronic mild stress, UCMS) 5 สัปดาห์ พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเอทานอลของมะปรางและหมากเฒ่าในขนาด 500 mg/kg/day เป็นเวลา 14 วันสามารถที่จะเพิ่มการบริโภคซูโครสขึ้นมาได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับสารสกัด และเมื่อทำการทดสอบด้วย forced swimming test (FST) และ tail suspension test (TST) พบว่าสารสกัดเอทานอลของมะปรางและหมากเฒ่าออกฤทธิ์ต้านซึมเศร้าโดยลด immobility time ได้ เช่นเดียวกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 25 mg/kg/day เมื่อศึกษากลไกในการต้านภาวะซึมเศร้า พบว่าสารสกัดเอทานอลทั้งของมะปรางและหมากเฒ่าออกฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้าโดยไปมีผลต่อการแสดงออกของยีน cAMP response element-binding (CREB) และ Brain derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA ในสมองส่วน hippocampus นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอทานอลทั้งของมะปรางและหมากเฒ่าอาจออกฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้าโดยอาจไปมีผลยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในสมองได้ด้วย นอกจากนี้จากการศึกษาปริมาณแร่ธาตุพบว่าในสารสกัดจากผลสุกของมะปราง มีแร่ธาตุที่ถูกตรวจพบโดยวิธีการศึกษาในครั้งนี้คือ ทองแดง เหล็ก สังกะสี ลิเทียม ตะกั่ว แคลเซียม แมกนีเซียม โดยพบในปริมาณที่แตกต่างกันในส่วนของน้ำคั้นและส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล โดยเฉพาะทองแดง และ สังกะสี จะพบปริมาณในน้ำคั้นมากกว่าจากส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล ในขณะที่ปริมาณแร่ธาตุชนิดอื่นพบในปริมาณที่ใกล้เคียงกันในส่วนสกัดทั้งสอง แต่จากการศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและ β -carotene ในสารสกัดผลมะปราง พบว่าในส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล จะพบในปริมาณที่สูงกว่าในส่วนของน้ำคั้นมากถึง 13 เท่า ส่วนการศึกษาในสารสกัดจากผลสุกของหมากเฒ่า มีการวิเคราะห์พบแร่ธาตุดังนี้คือ ทองแดง, เหล็ก, สังกะสี, ลิเทียม, ตะกั่ว, แคลเซียม, แมกนีเซียม โดยพบ แคลเซียม, แมกนีเซียม, เหล็ก และ สังกะสี ในปริมาณที่สูงทั้งในส่วนของน้ำคั้นและส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล โดยปริมาณพบสูงกว่าผลสุกของมะปรางถึง 2-3 เท่า สำหรับ เหล็ก และ ประมาณ 10 เท่าสำหรับ สังกะสี แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและ β -carotene ในสารสกัดผลหมากเฒ่า พบว่ามีปริมาณต่ำมากเมื่อเทียบกับมะปราง จากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ได้ข้อมูลในเชิงปริมาณของแร่ธาตุในส่วนสกัดทั้งสองจากผลสุกของมะปรางและหมากเฒ่า แต่จากการศึกษาก็น่าสนใจเกิดอีกประการก็คือ มีการตรวจพบปริมาณของตะกั่วในส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล ของผลไม้ทั้งสองชนิด ซึ่งน่าจะเป็นสิ่งที่ต้องพึงระวังในการบริโภค โดยอาจมาจากขั้นตอนของการเพาะปลูกและแหล่งของดินที่ใช้ในการเพาะปลูกก็เป็นไปได้

ผลการวิจัยในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฒ่าสุกมีฤทธิ์ในการป้องกันภาวะความจำเสื่อม และฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้าในสัตว์ทดลอง และยังพบแร่ธาตุบางชนิดที่เป็นประโยชน์ในการบริโภค น่าจะเป็นผลไม้ที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นทางเลือกใหม่เพื่อใช้ในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะของโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทโดยเฉพาะโรคอัลไซเมอร์และโรคซึมเศร้าต่อไป ดังนั้นผลงานวิจัยที่ได้จาก

โครงการนี้นับเป็นข้อมูลทางวิชาการและหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่มีประโยชน์อย่างยิ่งที่จะนำไปส่งเสริมให้ผู้บริโภคได้เห็นความสำคัญของการบริโภคผลไม้ชนิดนี้ โดยอาจบริโภคเป็นผลไม้สด หรือในรูปน้ำคั้น หรืออาจส่งเสริมการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชุมชนอื่นเพื่อเพิ่มมูลค่าของผลไม้ นอกจากนี้สารสกัดจากผลมะปรางและหมากเม่าน่าจะเป็นสารที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคทางระบบประสาทเช่นโรคอัลไซเมอร์และโรคซึมเศร้า แต่อย่างไรก็ตาม ก่อนนำไปพัฒนาต่อไปอาจจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึง กลไกการออกฤทธิ์ของสารในเชิงลึก การเกิดพิษในสัตว์ทดลอง ความคงตัวของผลิตภัณฑ์ และเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการควบคุมคุณภาพ การกำหนดมาตรฐานของผลไม้/สารสกัด/ผลิตภัณฑ์ และ วิธีการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เพื่อให้คงประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของมะปรางและหมากเฒ่า โดยมุ่งเน้นถึงฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทวิทยา รวมถึงวิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญ เช่น เบต้าแคโรทีน หรือ แร่ธาตุ ฤทธิ์ในการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ ของสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฒ่า 4 กลุ่มคือ น้ำคั้นจากผลหมากเฒ่า สารสกัดหมากเฒ่าด้วยเอทานอล น้ำคั้นจากผลมะปราง และ สารสกัดผลมะปรางด้วยเอทานอล จากการสกัดตัวอย่างผลมะปรางและหมากเฒ่าได้ร้อยละของปริมาณสารสกัด (%yield) จากทั้ง 2 วิธี ดังนี้คือ จากส่วนของน้ำคั้น พบร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้เทียบกับน้ำหนักสดและทำให้แห้งด้วยวิธี freeze drying เท่ากับ 2.14 % (มะปราง) และ 4.03 % (หมากเฒ่า) และจากการสกัดด้วย 95% เอทานอลและทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator พบร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้เทียบกับน้ำหนักสด เท่ากับ 1.11 % (มะปราง) และ 0.06 % (หมากเฒ่า) และพบร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้เทียบกับน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 8.25 % (มะปราง) และ 6.24 % (หมากเฒ่า) โดยทดสอบทั้งใน *In Vitro* cell culture และ *In Vivo* ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฒ่า 4 กลุ่มมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS assay โดยสารสกัดของผลมะปรางในชั้นเอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นแรงที่สุดด้วยค่า $IC_{50} = 73.28$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส และจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ดีในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาททั้งจากภาวะ oxidative stress ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย hydrogen peroxide และจาก beta amyloid โดยสารที่สกัดด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทได้ดีกว่าน้ำคั้น และเมื่อนำสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในชั้นเอทานอล มาทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ในแบบจำลองสัตว์ทดลอง Morris water maze test และ Modified Y-maze test พบว่าสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในขนาด 0.25 มก/กก สามารถลดเวลาในการหาแผ่นรอง (Escape latency time) ในการทดสอบ Morris water maze และสามารถเพิ่ม % of a new arm entry ในการทดสอบ Modified Y-maze test ของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Scopolamine เพียงอย่างเดียว ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่าทั้งสารสกัดจากผลมะปรางและผลหมากเฒ่ามีผลเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำและสามารถป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ได้ โดยมีผลทั้ง spatial short-term memory (ความจำระยะสั้น) และ spatial long term memory (ความจำระยะยาว)

ส่วนฤทธิ์ด้านภาวะซึมเศร้า ทดสอบทั้งในหนูปกติและหนูที่ถูกเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน (unpredictable chronic mild stress, UCMS) พบว่าในหนูปกตินั้นสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่า ให้ผลในการลดพฤติกรรมซึมเศร้าได้ดีกว่าน้ำคั้นมะปรางและหมากเฒ่า ทั้งในแบบทดสอบ forced swimming test (FST) และ tail suspension test (TST) โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity ในแบบทดสอบ open field test (OFT) จึงเลือกเฉพาะส่วนสารสกัดชั้นเอทานอลของมะปรางและหมากเฒ่าไปศึกษาในแบบจำลองหนูไม่ซีที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะซึมเศร้าจากการเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน 5 สัปดาห์ พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียด จะมีการบริโภคซูโครส ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อหนูได้รับสารสกัดเอทานอลของมะปรางและหมากเฒ่าในขนาด 500 มก/กก/วัน เป็นเวลา 14 วันสามารถที่จะเพิ่มการบริโภคซูโครสขึ้นมาได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับสารสกัด และเมื่อทดสอบด้วย FST และ TST ก็ให้ผลในการต้านซึมเศร้าโดยลด immobility time ได้ เช่นเดียวกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 25 มก/กก/วัน โดยกลไกในการต้านภาวะซึมเศร้า

น่าจะมาจากการที่สารสกัดเอทานอลทั้งของมะปรางและหมากเฒ่าสามารถที่จะทำให้การแสดง ออกของยีน cAMP response element-binding (CREB) และ Brain derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA ในสมองส่วน hippocampus กลับมาสู่สภาวะปกติได้ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อน เป็นระยะเวลานานที่มีการลดการแสดงออกของยีนทั้งสองตัวนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ความเครียดยังส่งผลต่อการเกิด lipid peroxidation ของสมองอีกด้วย โดยหนูกลุ่ม UCMS จะมีการเกิด lipid peroxidation ในสมองมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัด มะปรางและหมากเฒ่าสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในสมองได้ด้วย

นอกจากนั้น จากการศึกษาปริมาณแร่ธาตุและแคลโรทีนอยด์จากส่วนสกัดทั้งสองของผลสุกจากพืชทั้งสองชนิด พบว่าสารสกัดผลมะปรางในส่วนน้ำคั้นและ 95% เอทานอล พบทองแดง (4.38 ± 0.10 และ 1.57 ± 0.03 ไมโครกรัม/กรัม) เหล็ก (7.48 ± 0.59 และ 7.19 ± 0.22 ไมโครกรัม/กรัม) สังกะสี (3.24 ± 0.06 และ 1.14 ± 0.05 ไมโครกรัม/กรัม) ลิเทียม (0.35 ± 0.02 และ 0.22 ± 0.02 ไมโครกรัม/กรัม) ตะกั่ว (ไม่พบในส่วนน้ำคั้น และ 7.19 ± 0.22 ไมโครกรัม/กรัมจากส่วนสกัดเอทานอล) แคลเซียม (3.87 ± 0.04 และ 113.7 ± 0.21 ไมโครกรัม/กรัม) แมกนีเซียม (0.33 ± 0.00 และ 0.01 ± 0.00 มิลลิกรัม/กรัม) แต่จากวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่พบซีลีเนียมและโบรอน และพบว่าปริมาณแคลโรทีนอยด์รวมมีค่าเท่ากับ 0.13 ± 0.002 และ 13.29 ± 0.002 มิลลิกรัม/กรัม ส่วนสารสกัดผลหมากเฒ่าในส่วนน้ำคั้นและ 95% เอทานอล พบทองแดง (2.39 ± 0.14 และ 2.31 ± 0.06 ไมโครกรัม/กรัม) เหล็ก (18.96 ± 0.54 และ 16.42 ± 0.76 ไมโครกรัม/กรัม) สังกะสี (30.28 ± 0.20 และ 20.66 ± 0.22 ไมโครกรัม/กรัม) ลิเทียม (0.45 ± 0.01 และ 0.34 ± 0.05 ไมโครกรัม/กรัม) ตะกั่ว (0.15 ± 0.02 และ 7.21 ± 0.47 ไมโครกรัม/กรัม) แคลเซียม (1.44 ± 0.01 และ 1.37 ± 0.01 มิลลิกรัม/กรัม) แมกนีเซียม (1.68 ± 0.01 และ 3.21 ± 0.01 มิลลิกรัม/กรัม) แต่จากวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่พบซีลีเนียมและโบรอน และพบว่าปริมาณแคลโรทีนอยด์รวมมีค่าเท่ากับ 0.06 ± 0.14 และ 0.64 ± 0.06 มิลลิกรัม/กรัม โดยสรุปพบว่าจากผลสุกของผลไม้ทั้งสองชนิดพบแร่ธาตุหลายชนิด อาทิเช่น แคลเซียม แมกนีเซียม ทองแดง สังกะสี เหล็ก และพบปริมาณแคลโรทีนอยด์กับ เบต้า-แคโรทีนในปริมาณที่สูงในมะปราง ซึ่งจะเป็นข้อมูลทางโภชนาการที่สำคัญในการส่งเสริมการบริโภคผลไม้ทั้งสองชนิดนี้ต่อไป

ผลการวิจัยทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฒ่าซึ่งมีฤทธิ์ฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำและฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้าในสัตว์ทดลอง น่าจะเป็นผลไม้ที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อไปเป็นยารักษาโรคทางระบบประสาทเช่นโรคอัลไซเมอร์และโรคซึมเศร้า แต่อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

คำสำคัญ : ภาวะความจำเสื่อม ฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้า แร่ธาตุ มะปราง หมากเฒ่า

Abstract

In searching for a promising candidate for treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer or depression, the *Bouea macrophylla* Griffith and *Antidesma velutinsum* Blume extracts were investigated for neuroprotective effects by *in Vitro*, in cell culture and *in Vivo* models. From the extraction, the percent yield of water extract compared to fresh weight was 2.14% (*B. macrophylla*) and 4.03% (*A. velutinsum*) and the percent yield of the extraction using 95% ethanol was 1.11% (*B. macrophylla*) and 0.06% (*A. velutinsum*) when compared to fresh weight and 8.25% (*B. macrophylla*) and 6.24% (*A. velutinsum*) when compared to dried weight. For radical scavenging activity, all 4 extracts including ethanol extract and water extract of the *B. macrophylla* Griffith and *A. velutinsum* Blume showed an ability to scavenge ABTS radical. The ethanol extract of the *Bouea macrophylla* Griffith was the most potent extract with IC_{50} of 73.28 $\mu\text{g/ml}$. For acetylcholinesterase inhibitory action assessed by Ellman's colorimetric method, all 4 extracts showed no effect on acetylcholinesterase activity. In cell culture model, the four extracts exhibited protective effect against hydrogen peroxide and beta-amyloid-induced cell damage. The ethanol extracts were more potent than the extracts of water in the reduction of cell death. The ethanol extracts of both *Bouea macrophylla* Griffith and *Antidesma velutinsum* Blume were further investigated on the improvement of memory deficit in mice induced by scopolamine via Morris water maze test and modified Y-maze test. The results exhibited that both extracts at 250 $\mu\text{g/kg}$ could improve the memory deficit induced by scopolamine in both water maze test and modified Y-maze test which reflects in long-term memory and short-term memory, respectively.

The effects of the *Bouea macrophylla* Griffith and *Antidesma velutinsum* on antidepressive-like activity in mouse model were determined. For screening activity, fruit juice and the ethanol extract of the *Bouea macrophylla* Griffith (Maprang) and *Antidesma velutinos* (Mamao) showed the decreasing in immobility time in both forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST) without the effects on locomotor activity. The higher immobility time indicates a greater depressive state. The efficacy of the Ma Mao fruits juice and ethanolic extracts were found to be comparable to that of imipramine (25 mg/kg, i.p). In chronic treatment model of unpredictable chronic mild stress model, the ethanol extracts of Maprang and Mamao were evaluated. The results showed that the ethanol extracts of Maprang and Mamao significantly increased the sucrose consumption when compared with UCMS group. Chronic treatment of the ethanol extracts of Maprang and Mamao (500 mg/kg/days, 14 days) exhibited the decreasing of immobility time in both TST and FST, when compared with UCMS group. The mechanism underlying depressive activity may be involved in the effect of Maprang and Mamao on increasing CREB and BDNF mRNA expression. Because chronic mild stress significantly reduced these mRNA expressions when compare with nonstress control group. In addition, UCMS procedure induced the lipid peroxidation in mice brain. Chronic treatment of the ethanol extracts of Maprang and Mamao exhibited the inhibitory effect on lipid peroxidation. However, the exact mechanism of action should be further clarified to provide the strong evidences supporting the consumption and harvest of Thai fruits.

Moreover, from the analysis of elements and carotenoid content in these two ripe fruits, it was found that water and ethanol extract of *B. macrophylla* contained copper (4.38 ± 0.10 and 1.57 ± 0.03 $\mu\text{g/g}$), ferric (7.48 ± 0.59 and 7.19 ± 0.22 $\mu\text{g/g}$), zinc (3.24 ± 0.06 and 1.14 ± 0.05 $\mu\text{g/g}$), lithium (0.35 ± 0.02 and 0.22 ± 0.02 $\mu\text{g/g}$), lead (not detected in water extract but found 7.19 ± 0.22 $\mu\text{g/g}$ from ethanol extract), (3.87 ± 0.04 and 113.7 ± 0.21 $\mu\text{g/g}$) and magnesium (0.33 ± 0.00 and 0.01 ± 0.00 mg/g). Selenium and boron were not detected in this study. Total carotenoid contents in this fruit were 0.13 ± 0.002 and 13.29 ± 0.002 mg/g , in respectively. From the analysis in *A. velutinosum*, it was found that water and ethanol extract contained copper (2.39 ± 0.14 and 2.31 ± 0.06 $\mu\text{g/g}$), ferric (18.96 ± 0.54 and 16.42 ± 0.76 $\mu\text{g/g}$), zinc (30.28 ± 0.20 and 20.66 ± 0.22 $\mu\text{g/g}$), lithium (0.45 ± 0.01 and 0.34 ± 0.05 $\mu\text{g/g}$), lead (0.15 ± 0.02 and 7.21 ± 0.47 $\mu\text{g/g}$), calcium (1.44 ± 0.01 and 1.37 ± 0.01 mg/g), magnesium (1.68 ± 0.01 and 3.21 ± 0.01 mg/g) but selenium and boron were not found from the method used in this study. Total carotenoid contents in this fruit were 0.06 ± 0.14 and 0.64 ± 0.06 mg/g in respectively. It could be concluded that, some elements were found in these two ripe fruits such as calcium, magnesium, copper, zinc and ferric. In addition, the high content of carotenoids and beta-carotene was found in *B. macrophylla*. Thus, this information is important and can be used to promote the consumption of these fruits.

All results indicated that the *Bouea macrophylla* Griffith and *Antidesma velutinosum* Blume extracts could be promising candidates for the treatment of neurodegenerative disorders. However, the further study about the mechanism of action from these fruits should be done to confirm and developed into the product in the future.

keywords: Alzheimer, antidepressant, elements, *Bouea macrophylla*, *Antidesma velutinosum*

บทนำ

จากการศึกษาพบว่าปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างออกมามากกว่าปกติในร่างกายมีผลเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดโรคและพัฒนาการของโรคหลายชนิด โดยเฉพาะโรคทางระบบประสาทและการส่งสัญญาณสื่อประสาท (เช่นโรคอัลไซเมอร์ โรคซึมเศร้า และ โรคพาร์กินสัน) โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน และโรคที่เกิดจากการเสื่อมสลายตามอายุ (Di Giacomo CD *et al*, 2003) อนุมูลอิสระ คือสารซึ่งมีอิเล็กตรอนซึ่งไม่มีคู่อยู่ในวงรอบของอะตอม หรือโมเลกุล ทำให้มีความว่องไวอย่างมากในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นในร่างกาย อนุมูลอิสระที่พบในร่างกายมีหลายชนิดเช่น อนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น อนุมูลไฮดรอกซี อนุมูลเปอร์ออกซี และ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลอิสระชนิดอื่นที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น อนุมูลอิสระกลุ่มที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น ไนตริกออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ และอนุมูลกลูตาไธอิล และอนุมูลเมทิล โดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการหายใจ กระบวนการเผาผลาญพลังงาน และร่างกายก็จะมี ระบบการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ด้วยสารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนท์ เช่น กลูตาไธโอน superoxide dismutase, catalase และ peroxidase เอนไซม์ เป็นต้น แต่ถ้าร่างกายมีการสร้างอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจากภาวะเครียด ภาวะอักเสบ มีการติดเชื้อ หรือมีภาวะการรบกวนของโรคต่างๆ หรืออาจจะได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอกมากเกินไป ตัวอย่างเช่น ได้รับจากอาหารบางชนิด จากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่อุณหภูมิสูงๆ มาใช้อีก หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสี ultraviolet การแผ่รังสี (radiation) รังสี x-ray หรือจากมลพิษ เช่น คาร์บอน หรือ ก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ ถ้าสารเหล่านี้มีมากกว่าความสามารถของแอนติออกซิแดนท์ในร่างกายจะขจัดหมด หรือในภาวะที่จำนวนแอนติออกซิแดนท์ในร่างกายลดลง ก็จะทำให้ร่างกายเกิดภาวะที่ไม่สมดุล ที่เรียกว่าภาวะเครียดออกซิเดชันเกิดขึ้น (Floyd RA and Hensley K., 2002) อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน (โดยเฉพาะ low density lipoprotein) โปรตีน หน่วยสารพันธุกรรม ดีเอ็นเอ และคาร์โบไฮเดรต ทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด มีผลเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดพยาธิสภาพต่างๆในร่างกาย เช่น ภาวะสมองขาดเลือด, ภาวะเส้นเลือดในสมองตีบตันหรือแตก โรคเมะเร็งบางชนิด, โรคไขข้ออักเสบ, ภาวะการอักเสบและภาวะช็อคจากการติดเชื้อ รวมทั้งโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของระบบประสาท โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน และโรคซึมเศร้า (Jeandel C *et al*, 1989 and Di Giacomo CD *et al*, 2003) นอกจากนี้ในสภาวะที่มีอนุมูลอิสระในไนตริกออกไซด์ปริมาณมากร่วมกับสภาวะออกซิไดซ์ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์เกิดเป็นเปอร์ออกซีไนโตร (ONOO⁻) ซึ่งมีความไวในการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้เร็วกว่า จึงมีความเป็นพิษสูงและมีฤทธิ์ทำลายสารชีวโมเลกุลอื่นได้มากกว่า จึงมีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ เหล่านี้ได้รุนแรงขึ้น ดังนั้นการกำจัดหรือการยับยั้งการสังเคราะห์อนุมูลอิสระน่าจะเป็นวิธีการหนึ่งที่สำคัญที่ช่วยลดการเกิดพยาธิสภาพเหล่านี้ลง

สารที่มีบทบาทอย่างมากคือสารต้านอนุมูลอิสระ ในทางเคมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ ๒ ทาง คือ ช่วยลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายและ ลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ แม้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถแก้ไขความเสียหายที่เกิดขึ้นแล้ว แต่สามารถชะลอให้ความเสียหาย เกิดช้าลงได้โดยเฉพาะโรคเรื้อรังซึ่งเป็นผลลัพธ์สะสมที่เกิดจากเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกายถูกทำอันตรายและเสียหายเป็นปี (โดยมากเป็นเวลหลายสิบปี) เห็นได้จากการรวบรวมความชุกของโรคว่าโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เป็นมากในผู้ใหญ่วัยกลางคนหรือผู้สูงอายุ ดังนั้นบุคคลทุกเพศทุกวัยจึงควรได้รับสารต้าน

อนุมูลอิสระให้พอเพียงต่อความต้องการในแต่ละวัน เพื่อให้เกิดความสมดุลในร่างกายระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระ และอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น

แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีมากตามธรรมชาติพบได้ทั้งในอาหาร พืช ผัก และผลไม้ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidants) ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี ซีลีเนียม บีตาแคโรทีน วิตามินเอ พฤษเคมีต่างๆ (phytochemicals) เช่น สารประกอบฟีนอลิก (polyphenol) จากชาและสมุนไพรบางชนิด ไอโซฟลาโวน (isoflavones) จากถั่วเหลือง เป็นต้น เพื่อให้ร่างกายได้รับสารต้านอนุมูลอิสระพอเพียงกับความต้องการ เราควรกินผักผลไม้สดเป็นประจำ เพราะผักและผลไม้เหล่านี้มีสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติเป็นส่วนประกอบอยู่มากมาย ทั้งนี้เพื่อเป็นการส่งเสริมการมีสุขภาพที่ดี แข็งแรงอยู่เป็นประจำ

จากรายงานการศึกษาวิจัยทางด้านประสาทวิทยาอย่างมากมายในปัจจุบัน ทำให้ทราบว่าการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากการที่มีการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินไป มีบทบาทอย่างมากในการทำให้เกิดพยาธิสภาพทางสมอง มีส่วนทำให้เซลล์ประสาทไม่เจริญเติบโต โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคหนึ่งที่มีการทำลายเซลล์ประสาทอันเนื่องมาจากมีอนุมูลอิสระในปริมาณสูงซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการทางสมองเสื่อมในผู้สูงอายุ โรคอัลไซเมอร์เป็นความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง โดยพบว่าผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะมีความผิดปกติของระบบสื่อสารประสาทในสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำโดยเฉพาะที่ Hippocampus และ neocortex ซึ่งเป็นสาเหตุของการตายของเซลล์สมอง (Rodriguez-Franco MI *et al*, 2006) จากการตรวจชิ้นเนื้อสมองจะพบว่า ในเนื้อสมองจะมีการสะสมของโปรตีนที่จับตัวเป็นก้อนแข็งผิดปกติกระจายอยู่ทั่ว ๆ ไปในเนื้อสมองทั้งภายในและภายนอกเซลล์ประสาท ภายนอกเซลล์ประสาทจะมีการสะสมโปรตีนที่จับตัวกันเป็นก้อน ที่เรียกว่า amyloid plaque และส่วนภายในเซลล์ประสาทจะมี Tangle ซึ่งเกิดจากการรวมกลุ่มสะสมของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับไมโครทิวบูล ชื่อว่า โปรตีนเทา (tau protein) ซึ่งถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติ (Scarpini E *et al*, 2003) รวมทั้งพบการทำลายเซลล์ประสาทโคลิเนอร์จิก ในส่วน basal forbrain ของสมอง (Selkoe DJ *et al*. 2001)

สาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาได้มีความพยายามวิจัยเพื่อศึกษากลไกการเกิดโรคนี้ ซึ่งพบว่ามีหลายสมมติฐานที่นำมาใช้อธิบายสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพของโรค โดยพบว่าอาจเกี่ยวข้องกับการลดลงของสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน (ACh) (Khachaturian ZS *et al*, 1985), การสะสมของ beta amyloid (Bourdel-Marchasson I *et al*, 2001) และ neurofibrillar tangle, และการเกิดภาวะ oxidative stress (Bourdel-Marchasson I *et al*, 2001, Pratico D *et al*, 2001) สมมติฐานแรกคือ สมมติฐานโคลิเนอร์จิก (cholinergic hypothesis) อธิบายว่าสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคอัลไซเมอร์อาจเกิดจากความผิดปกติของระบบสื่อสารประสาทของอะซิติลโคลีน โดยพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์จะมีระดับของอะซิติลโคลีนลดลงอย่างมาก ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ความสามารถในการจำและการใช้เหตุผลของผู้ป่วยลดลง (Wilkinson DG *et al*, 2004) ปริมาณสารอะซิติลโคลีนนี้ ส่วนหนึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยอะซิติลโคลีนทำให้สารสื่อประสาทนี้มีปริมาณน้อยลงในสมอง ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนายาซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งจะให้มีสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนในสมองเพิ่มมากขึ้นทำให้ช่วยฟื้นฟูความจำที่บกพร่อง (Giacobini E, 2004) ปัจจุบันยากลุ่มนี้ได้รับการรับรองให้สามารถใช้ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้ ซึ่งในปัจจุบันมีจำหน่ายอยู่ไม่กี่ชนิด เช่น tacrine (Kurz A, 1998), Donepezil (Sugimoto H, 2001), Galantamine (Zarotsky V *et al*, 2003) และ Rivastigmine (Jann MW, 2000) แม้ว่ายาในกลุ่มนี้จะมีฤทธิ์ดีในการช่วยฟื้นฟูความจำ ช่วยควบคุมอาการต่างๆ ให้น้อยลงแต่โรคจะยังคงดำเนินต่อไปเรื่อยๆ

ในปี ค.ศ. 1991 มีการตั้ง สมมติฐาน amyloid (amyloid hypothesis) ซึ่งเชื่อว่าการสะสมของ beta amyloid เป็นสาเหตุหลักของโรคอัลไซเมอร์ (Hardy J and Allsop D, 1991) beta amyloid เป็นส่วนประกอบของโปรตีนต้นกำเนิด amyloid (Amyloid precursor protein; APP) โปรตีนนี้เป็นทรานสมเมมเบรนโปรตีน (transmembrane protein) ที่แทรกทะลุผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท โปรตีน APP มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต การดำรงชีวิต และการซ่อมแซมของเซลล์ประสาท (Priller C *et al*, 2006) ในโรคอัลไซเมอร์จะมีการสลายโปรตีน APP (proteolysis) โดยตัดสาย APP ด้วยเอนไซม์ secretase (Hooper NM, 2005) ได้เป็น beta amyloid ซึ่งจับตัวกันหนาแน่นอยู่นอกเซลล์ประสาท ซึ่งเรียกว่า senile plaques (Ohnishi S and Takano K, 2004) ก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ โดยพบว่า beta amyloid จะทำลายเซลล์ประสาทโดยการปลดปล่อยอนุมูลอิสระ H_2O_2 ออกมา ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นและการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาสารยับยั้งเอนไซม์ secretase เพื่อลดการสร้าง beta amyloid แต่ยากลุ่มนี้ยังอยู่ในขั้นตอนการศึกษาและพัฒนา ยังไม่มีการนำมาใช้ในทางคลินิก

สมมติฐานโปรตีนเทา (tau hypothesis) สมมติฐานนี้เชื่อว่าโปรตีนเทาที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไป (hyperphosphorylated tau) จะจับคู่กับโปรตีนเทาปกติสายอื่นๆ เกิดเป็น neurofibrillary tangles สะสมภายในตัวเซลล์ประสาท (Goedert M *et al*, 1991) ผลดังกล่าวทำให้ไมโครทิวบูลสลายตัว และทำลายระบบการขนส่งสารในเซลล์ประสาท กระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดความผิดปกติในการสื่อสารทางชีวเคมีระหว่างเซลล์ประสาท และทำให้เซลล์ตายในเวลาต่อมา (Chun W and Johnson GV, 2007)

นอกจากนี้ยังพบว่าในผู้สูงอายุระบบการกำจัดอนุมูลอิสระ (antioxidant defense system) ในร่างกายเสื่อมประสิทธิภาพลง จึงทำให้มีอนุมูลอิสระสะสมในร่างกายมากขึ้นเป็นผลให้เซลล์ถูกทำลายเนื่องจากภาวะ oxidative stress จากการวิจัยเมื่อเร็วๆ นี้ ชี้ให้เห็นว่าการทำลายเซลล์ด้วยอนุมูลอิสระซึ่งเป็นผลจากการสะสม beta amyloid Plaques และ phosphorylated tau protein เป็นกระบวนการที่สำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นและการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ (Floyd RA and Hensley K, 2002) ดังนั้นสารที่ออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันการทำลายเซลล์ที่เกิดจากอนุมูลอิสระจาก beta amyloid (Tan DX *et al*, 2003) และมี antioxidant หลายชนิดที่ถูกทดสอบในขั้น Clinical trial ในต่างประเทศได้มีการพัฒนาและนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้ป้องกันและรักษาโรคอัลไซเมอร์ เช่น huperzine A จากมอส (Huperzia serrata) (Sugimoto H, 2001) EGb 761 จากใบแปะก๊วย (Ginkgo biloba) (Zarotsky V *et al*, 2003) hydroxystilbene resveratrol จากเปลือกของผลองุ่นดำ (Jann MW *et al*, 2002) Dipsacussaponin C จากรากพืช (Kurz A, 1998) Dipsacus asper Wall และ (-)-galanthamine จากดอกของพืช Galanthus nivalis (Lipton SA, 2006) ปัจจุบันได้มีการนำสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติหลายชนิดมาใช้ร่วมกันเพื่อเสริมฤทธิ์ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ เช่น การใช้สารสกัดจากใบแปะก๊วยร่วมกับสารสกัดจากรากโสม เป็นต้น

นอกจากนี้จากรายงานการศึกษาวิจัยทางด้านประสาทวิทยา พบว่าการเสื่อมของเซลล์ประสาท จากการที่มีการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินไปจากความเครียด มีบทบาทอย่างมากในการทำให้เกิดพยาธิสภาพทางสมอง มีส่วนทำให้เซลล์ประสาทไม่เจริญเติบโตซึ่งส่งผลทางอ้อมต่อการเกิดโรคซึมเศร้า

ในขณะเดียวกันจากสภาพสังคมที่มีการแข่งขันกันสูง ราคาน้ำมันแพงขึ้นมาก ประกอบกับสภาวะเศรษฐกิจที่ถดถอยในปัจจุบัน ได้ส่งผลกระทบต่อการดำเนินชีวิต สภาพความเป็นอยู่ และสภาพจิตใจของประชาชนเป็นอย่างมาก ทำให้เกิดความเครียด ความวิตกกังวล ภาวะซึมเศร้า โรคทางจิตต่างๆ โดยที่บางครั้งประชาชนอาจไม่รู้ตัว จนกระทั่งความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้น ก่อให้เกิดปัญหาการฆ่าตัวตายตามมา ปัญหาการฆ่าตัวตายมีปัจจัยจากหลายสาเหตุ สาเหตุหลักของการฆ่าตัวตายคือ การป่วยเป็นโรค

ซึมเศร้า (depressive disorder) ปัจจุบันมีผู้ป่วยด้วยโรคซึมเศร้าในประเทศไทย 5% ของจำนวนประชากรทั้งหมด หรือกว่า 3 ล้านคน ซึ่งถือว่าค่อนข้างเยอะ และนำไปสู่การสูญเสียสมรรถภาพของบุคคลและเศรษฐกิจทางสังคม ความสูญเสียทางสุขภาพที่เกิดจากโรคซึมเศร้านี้ WHO (2001) ได้จัดลำดับโรคทางจิตเวชอยู่ใน 20 อันดับแรกถึง 3 โรคซึ่งเป็นกลุ่มที่นำไปสู่การมีคุณภาพชีวิตที่ไม่ดี (Disease burden) และได้ประมาณการว่าโรคซึมเศร้ารุนแรงจะเป็นภาระต่อสังคมเศรษฐกิจ จากอันดับ 7 ในปี 1990 เป็นอันดับ 1 เคียงคู่กับโรคหัวใจขาดเลือด ในปี 2020 ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่สังคมเร่งตระหนักว่า ภาวะซึมเศร้าเป็นโรคหนึ่ง ซึ่งไม่ใช่นิสัยหรือกิจวัตรปกติของคนๆ หนึ่ง (รณชัย คงสกนธ์ และคณะ, 2548)

กลไกการเกิดโรคซึมเศร้า ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด สมมุติฐานหนึ่งคือ มีการลดลงอย่างมากของระดับสารสื่อประสาทจำพวก serotonin ทำให้ส่งผลต่อการแสดงออกทางด้านพฤติกรรม อีกหนึ่งทฤษฎีที่แพร่หลายเป็นอย่างมากในปัจจุบันคือ neurotrophic theory ซึ่งเป็นทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์ประสาทที่ลดลง พร้อมทั้งมีการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ทำงานเกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า หนึ่งในกลไกที่เชื่อว่ามีส่วนสำคัญในการเสื่อมของเซลล์ประสาทคือ การเพิ่มขึ้นของ glutaminergic transduction และมีการเพิ่มขึ้นอย่างมากของกลูตาเมต ส่งผลให้เกิด excitotoxicity ได้ การกระตุ้น glutamate neuron เป็นระยะเวลานาน พบว่า จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างมากของอนุมูลอิสระ จากการศึกษานี้ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้า พบว่ามีระดับของ proinflammatory cytokines เช่น interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), และ tumor necrosis factor alpha (TNF- α) สูงมากกว่าคนที่มีสุขภาพดี สารที่เป็น proinflammatory cytokines นี้จะมีผลเพิ่มการทำงานของ hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA axis) ซึ่งเป็นระบบที่ความคุมเกี่ยวกับการตอบสนองต่อภาวะความเครียด ส่งผลให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระมากขึ้นไปอีก อนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปทำให้เกิดความเสื่อมของเซลล์ประสาท โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ประสาทชนิด serotonergic neuron ซึ่งมีผลอย่างมากต่อ serotonergic activity ซึ่งผู้ป่วยที่มีอาการของโรคซึมเศร้าพบว่าจะมี serotonergic activity ลดลง และมีการเสื่อมของเซลล์ประสาทชนิด serotonergic neuron และเซลล์ประสาทอื่นๆใน hippocampus area มีการลดลงของกระบวนการ neurogenesis และมีการเพิ่มขึ้นของกระบวนการ neurodegeneration (Catenadell'osso M *et al.*, 2010)

การรักษาโรคซึมเศร้า ประกอบด้วยการรักษาหลายแบบ เช่น จิตบำบัด การเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม การให้คำแนะนำ และการจัดการกับความเครียดที่เป็นสาเหตุของโรคร่วมกับการให้กำลังใจ ประคับประคองทางจิตใจ ในรายที่เป็นไม่รุนแรง ส่วนในรายที่เป็นรุนแรงอาจต้องมีการได้รับยาอย่างสม่ำเสมอ หรือเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล ยาด้านภาวะซึมเศร้าที่มีขายในปัจจุบันแบ่งได้เป็นหลายชนิดด้วยกัน ยาที่มีใช้กันอยู่ดั้งเดิมคือยาในกลุ่ม Tricyclic antidepressant เช่น amitriptyline, imipramine, desipramine และ ยาที่ใช้รักษาโรคจิต เช่น haloperidol และ thioridazine ซึ่งต่อมาพบว่ายาสองกลุ่มนี้ ก่อให้เกิดพิษต่อระบบหัวใจ ทำให้หัวใจเต้นผิดจังหวะ ยา กลุ่มที่ได้รับการพัฒนาต่อมาคือ ยาด้านการซึมเศร้าที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการดึงกลับของเซโรโทนินอย่าง เฉพาะเจาะจง ได้แก่ยา fluoxetine, fluvoxamine, paroxetine เป็นต้น แม้ว่ายาเหล่านี้ให้ผลการรักษาผู้ป่วยไม่แตกต่างไปจากยาในกลุ่มดั้งเดิม แต่ก็เป็นที่นิยมอย่างมากในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมา ทั้งนี้เนื่องมาจากว่ายาเหล่านี้มีพิษต่อระบบหัวใจน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม จากการติดตามอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา พบว่าการใช้ยาเหล่านี้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานมีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดหัวใจเต้นผิดจังหวะ และคลื่นไฟฟ้าหัวใจผิดปกติ ในคนไข้ที่ไม่เคยมีประวัติโรคหัวใจมาก่อน ดังนั้น จึงเริ่มมีการทบทวนถึงความปลอดภัยในการใช้ยาเหล่านี้มากขึ้น (Pacher P *et. al*, 2004)

ปัจจุบันแนวความคิดค้นและพัฒนาายากลุ่มใหม่เพื่อนำมาใช้รักษาโรคซึมเศร้า จึงมุ่งเน้นไปหาสารจากธรรมชาติมากขึ้น เนื่องจากสารจากธรรมชาติ สมุนไพร มีการใช้มานาน และกว้างขวาง มีความปลอดภัยสูง

สารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิด ถูกนำมาเป็นสารต้นแบบในการพัฒนายาใหม่มากมาย St. John's wort (*Hypericum perforatum*) เป็นพืชสมุนไพรตัวแรกที่ถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ด้านการซึมเศร้าที่ดี และมีผลข้างเคียงน้อย ในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมา มีการศึกษามากมายที่ยืนยันว่า สารสกัด St. John's wort ให้ผลการรักษาโรคซึมเศร้าในได้ดีพอๆกับยาต้านการซึมเศร้าที่มีอยู่เดิม ทั้งในคนยุโรปและสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตามก็มีรายงานว่าสารสกัดนี้มีผลเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำยาต่างๆมากมาย ซึ่งอาจจะส่งผลในคนไข้ที่ได้รับยาหลายตัวร่วมกัน (Schulz V et al, 2006, Bilia AR et al. 2002) ดังนั้น การคิดค้นพัฒนายาต้านภาวะซึมเศร้าตัวใหม่ จึงยังเป็นที่น่าสนใจศึกษาต่อไป สารสกัด St. John's wort ประกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆมากมาย หนึ่งในสารประกอบที่น่าสนใจคือสารฟลาโวนอยด์ จากการศึกษาค้นคว้าของ Butterweck V. และคณะพบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่ม xanthone ที่ได้จาก St. John's wort มีฤทธิ์ด้านการซึมเศร้าในหนูทดลอง (Butterweck V, et al, 2000)

จากทฤษฎี neurotrophic theory ที่เชื่อว่ามีสร้างเซลล์ประสาทลดลง และมีการเสื่อมของเซลล์ประสาทในผู้ป่วยโรคซึมเศร้า ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระในสมองของคนไข้โรคซึมเศร้า จึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งสำหรับการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง และนำมาใช้เป็นยาในการรักษาภาวะเครียด และซึมเศร้า เพื่อลดการเสื่อมของเซลล์สมอง และอาจจะเพิ่มแนวทางการรักษาคนไข้เป็นแบบ combine therapy ได้ โดยให้ร่วมกันระหว่างยาต้านซึมเศร้าและสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนมากสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเป็นที่นิยมกว่าสารที่ได้จากการสังเคราะห์ เนื่องจากมีความเป็นพิษน้อยกว่า และผลไม่ไทยก็เป็นผลไม่ที่มีสารต้านออกซิเดชันสูงอีกด้วย จึงน่าจะเป็นการส่งเสริมการบริโภคผลไม้ไทย เพื่อให้เกิดโภชนาการที่ดี ส่งผลสุขภาพที่ดีทั้งกายและใจ

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาจำนวนมากยืนยันถึงการลดอัตราเสี่ยงและเพิ่มอัตราการป้องกันการเกิดโรคทางระบบประสาท โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ รวมทั้งโรคอื่นๆที่มีความสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระจากการบริโภคผักผลไม้ ซึ่งผลดังกล่าวมาจากมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประเภทวิตามินซี เบต้า-แคโรทีน แคโรทีนอยด์ รวมทั้งสารกลุ่มโพลีฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ ฟีนิลโพรพานอยด์ เป็นต้น โดยในปัจจุบันพบว่าสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพ อีกทั้งสภาพภูมิอากาศดังกล่าวมีความเหมาะสมกับการเพาะปลูกพืชพันธุ์ธัญญาหาร ด้วยเหตุนี้เองทำให้ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตอาหารที่สำคัญของโลก โดยเฉพาะผลไม้เขตร้อน เรามีผลไม้หลายชนิดมาก มีทั้งชนิดที่ออกผลทั้งปี และ ออกตามฤดูกาล ผลไม้ไทยมีรสชาติดีหลายชนิดเป็นที่นิยมของต่างชาติ เป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้สูง นอกจากรสชาติที่ดีแล้วผลไม้เหล่านั้นยังอุดมสมบูรณ์ไปด้วยสารอาหารมากมาย เช่น วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น นอกจากสารอาหารแล้วผลไม้ต่างๆ โดยเฉพาะผลไม้ที่มีสีสดยังเป็นแหล่งสำคัญของสารสำคัญ ซึ่งพบในพืชผักต่างๆ และได้มีการ ศึกษากันอย่างกว้างขวางพบว่า สารสำคัญเหล่านี้มีบทบาทในการส่งเสริมสุขภาพและช่วยป้องกันการเกิดโรคต่างๆ

มะปราง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Bouea macrophylla* Griffith เป็นชื่อของผลไม้เมืองร้อนชนิดหนึ่ง ที่อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae (วงศ์เดียวกับ มะม่วง มะกอก ฯลฯ) โดยลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะปราง มีทรงต้นค่อนข้างแหลม มีใบมาก ไม่มีผลัดใบนอก กิ่งก้านแตกแขนงจนทึบ รากแก้วค่อนข้างแข็งแรงมากจึงสามารถทนความแห้งแล้งได้ดี ดอกออกเป็นช่อและก็มีสีเหลืองเมื่อบาน ผลของมะปรางจะมีขนาดพอๆ กับไข่ของนกพิราบและก็มีสีเหลืองหรือสีเหลืองอมส้มเวลาสุก มีรสชาติหวาน หวานอมเปรี้ยว มะปรางจึงเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในเมืองไทย ในปัจจุบันได้มีความพยายามปรับปรุงพันธุ์ให้มีรสชาติดี และมีขนาดของผลที่ใหญ่ขึ้นเพื่อเพิ่มมูลค่าของตัวสินค้า จากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น พบว่า

สารสกัดจากผลมะปรางแสดงศักยภาพที่ดีในการต้าน lipid-peroxidation แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าการศึกษาดังกล่าวถึงคุณประโยชน์ต่อสุขภาพในการบริโภคมะปรางนั้นยังมีไม่มากนัก

หมากเฒ่า (มะเฒ่า เฒ่าเสี้ยน มัดเซ) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Antidesma velutinsum* Blume ในวงศ์ Stilaginaceae เป็นผลไม้สมุนไพร สายพันธุ์เดียวกับเบอร์รี่ เป็นผลไม้ขึ้นน้ำในเขตภาคอีสาน ส่วนภาคอื่นๆ เรียกว่า 'เฒ่า' เป็นไม้ยืนต้นไม่ผลัดใบ ความสูงประมาณ 12-15 เมตร ชาวภาคอีสานจะนำหมากเฒ่าสุกที่มีสีดำมาคั้นน้ำให้คนไข้ดื่ม จะช่วยให้ฟื้นไข้เร็ว เป็นพืชที่นิยมมาทำเป็นไวน์ผลไม้ ซึ่งเป็นสินค้าส่งออกที่ต่างชาตินิยมเป็นอย่างมาก กัมมาลและคณะ (2546) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV เชื้อรา เชื้อแบคทีเรียของหมากเฒ่า พบว่าหมากเฒ่ามีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ได้ สมานและสำรี (2549) ได้ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารโพลีฟีนอลในไวน์หมากเฒ่าต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งในระดับห้องทดลองและหนูทดลองพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งในระดับห้องทดลองและหนูทดลองที่ดีกว่าสารโพลีฟีนอลมาตรฐานเคอร์เซติน

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฒ่าแสดงฤทธิ์ต้าน lipid-peroxidation ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีความเชื่อมโยงกับภาวะผิดปกติในร่างกายดังที่ได้กล่าวไปแล้ว จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งหากได้มีการศึกษาค้นคว้าถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของมะปรางและหมากเฒ่าอย่างเป็นระบบในเชิงวิทยาศาสตร์จากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น พบว่าสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฒ่าแสดงศักยภาพที่ดีดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ คณะนักวิจัยจึงเล็งเห็นว่าควรมีการวิจัยต่อเนื่องถึงผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของมะปรางและหมากเฒ่า โดยมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ต่อโรคทางระบบประสาท เช่น ฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท ผลในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อม และ ผลการต้านภาวะซึมเศร้า นอกจากนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางโภชนาการมากยิ่งขึ้น ทางคณะผู้วิจัยจึงได้วิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์และแร่ธาตุที่เป็นสารอาหารรอง หรือ Trace elements ที่ยังพบว่ามีการศึกษาวิจัยไม่ครอบคลุมและครบถ้วนร่วมด้วย ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงคุณประโยชน์ของการบริโภคผลไม้ไทยอย่างแท้จริง โดยเฉพาะในแง่ของการป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุขึ้นเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ โดยผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลและหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อเพิ่มมูลค่าของผลไม้ไทยในการส่งออก พร้อมทั้งส่งเสริมให้ผู้บริโภคได้เห็นความสำคัญของผลไม้ชนิดนี้ โดยเฉพาะประโยชน์ในแง่โภชนาการ และการช่วยป้องกันการเกิดโรคต่างๆ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเตรียมสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฒ่า
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อม
 - 2.1 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสด้วยวิธี modified Ellman's spectrophotometric method
 - 2.2 ประเมินความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาท neuroblastoma โดยวิธี MTT assay
 - 2.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องมาจาก Hydrogen peroxide โดยวิธี cell based assay
 - 2.4 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid โดยวิธี cell based assay
 - 2.5 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องจากได้รับ scopolamine ในหนูเมาส์ โดยวิธี Y-maze

3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านภาวะซึมเศร้า

3.1 เพื่อคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านภาวะซึมเศร้าโดยใช้แบบจำลอง tail suspension test และ/หรือ Forced swimming test

3.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า ในแบบจำลอง Unpredictable chronic mild stress (UCMS model)

3.3 เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าของสารสกัดโดยดูถึงการแสดงออกระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า และดูถึงผลของสารสกัดต่อการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย

4. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์และแร่ธาตุที่เป็นสารอาหารรองที่พบในสารสกัด

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

มะปรางและหมากเฒ่าที่ใช้ในการทดลองนั้นจะเป็นผลสุกพร้อมรับประทาน โดยแหล่งที่มาของผลมะปรางมาจากเขตอำเภอบัวโบสถ์ จังหวัดพิษณุโลก ส่วนผลหมากเฒ่าได้เก็บตัวอย่างมาจากเขตอำเภอกุพพาน จังหวัดสกลนคร ตัวอย่างที่เก็บได้นำมาแยกส่วนของเมล็ดออก แล้วนำมาแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปลดขนาดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นแล้วคั้นเอาส่วนน้ำ นำไปทำให้แห้ง โดยวิธี freeze drying ส่วนที่ 2 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำไปบดเป็นผงละเอียด จากนั้นนำไปหมักด้วย 95 % เอทานอล (อัตราส่วน 1 กรัม/เอทานอล 4 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน โดยการใช้เอทานอล 95% แทน 50% (จากเดิมที่ได้รับไว้ในแผนงานว่าจะใช้ส่วนของน้ำคั้น หรือ ส่วนสกัดจาก 50% เอทานอล อย่างใดอย่างหนึ่ง แต่ได้หารือกับคณะผู้วิจัยได้ข้อสรุปว่าจะทำทั้งส่วนที่เป็นน้ำคั้นและส่วนสกัดจากเอทานอล 95% แทน 50% เนื่องจากจะได้ข้อมูลที่ครอบคลุมและครบถ้วนมากขึ้นกว่าเดิม) ส่วนสกัดที่ได้นำไปกรองและทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator

2. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อม

วิธีการศึกษา

2.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี ABTS assay

วิธีนี้เป็นวิธีวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทางอ้อมโดยการเปลี่ยนสาร 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS ให้อยู่ในรูปอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ โดยการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ทำโดยละลาย ABTS 0.0036 กรัม และ $K_2S_2O_8$ 0.00067 กรัม ในน้ำ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเจือจางสารละลาย $ABTS^{++}$ ที่ได้ด้วย เอทานอล จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรเป็น 0.7 ± 0.02 ($ABTS^{++}$ stock solution) หลังจากนั้นผสมสารสกัดหมากเฒ่า สารสกัดมะปราง หรือสารมาตรฐาน trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ 10 μL และ $ABTS^{++}$ stock solution 990 μL เข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm

2.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในการยับยั้งเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยวิธี modified Ellman's spectrophotometric method

ทดสอบทดสอบดูความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยวิธี modified Ellman's colorimetric method โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ well plate ชนิด 96 หลุม เติมน้ำแต่ละหลุมด้วย

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์หรือสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วเติม 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสับสเตรต คือ อะเซทิลโคลีนไอโอไดด์ (acetylcholine iodide) 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 405 นาโนเมตร ทุกๆ 2 นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

2.3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมะพร้าวและหมากเม่าต่อเซลล์ประสาท

Neuroblastoma

เพาะเลี้ยง neuroblastoma cell (NG108-15) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งประกอบด้วย 100 μ M hypoxanthine, 16 μ M thymidine, 1 μ M aminopterin, 4% fetal bovine serum และ minocycline (1 μ g/ml) ในถาดเพาะเลี้ยง ขนาด 100 mm x 10 mm ในตู้บอดูอุณหภูมิ 37°C หล่อเลี้ยงด้วย 5%CO₂ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุก 2 – 3 วัน เซลล์จะถูกทดสอบโดยนำมาเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยง 96 หลุม 2 วัน

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาทโดยนำสารที่ความเข้มข้นต่างๆ (1 – 100 μ g/ml) มาบ่มกับเซลล์ประสาทในถาดเพาะเลี้ยง 96 หลุม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโดยตรวจวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ ด้วยวิธี MTT reduction assay

2.4 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะพร้าวและหมากเม่าในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องมาจาก Hydrogen peroxide โดยวิธี cell based assay

เพาะเลี้ยง neuroblastoma cell (NG108-15) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งประกอบด้วย 100 μ M hypoxanthine, 16 μ M thymidine, 1 μ M aminopterin, 4% fetal bovine serum และ minocycline (1 μ g/ml) ในถาดเพาะเลี้ยง ขนาด 100 mm x 10 mm ในตู้บอดูอุณหภูมิ 37°C หล่อเลี้ยงด้วย 5%CO₂ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุก 2 – 3 วัน เซลล์จะถูกทดสอบโดยนำมาเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยง 96 หลุม 2 วัน

ทดสอบความสามารถในการป้องกันการทำลายเซลล์ โดยนำสารที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น (0.1 – 100 μ g/ml) มาบ่มกับเซลล์ที่ได้ในถาดเพาะเลี้ยง 96 หลุม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย buffer ต่อจากนั้นเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย 250 μ M Hydrogen Peroxide 2 ชั่วโมง ทดสอบความสามารถในการป้องกันการทำลายเซลล์โดยตรวจวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ด้วยวิธี MTT reduction assay

2.5 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะพร้าวและหมากเม่าในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid โดยวิธี cell based assay

เพาะเลี้ยงเซลล์ Rat C6 astrogloma cell (C6 cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 IU/ml penicillin และ 50 g/ml streptomycin ในถาดเพาะเลี้ยง ขนาด 100 mm x 10 mm ในตู้บอดูอุณหภูมิ 37°C หล่อเลี้ยงด้วย 5%CO₂ อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนทุก 2 – 3 วัน เซลล์จะถูกทดสอบโดยนำมาเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยง 96 หลุม 1 วัน

ทดสอบโดยนำสารสกัดมะพร้าวและหมากเม่ามาทดสอบฤทธิ์ด้านการทำลายเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid โดยวิธี MTT colorimetric assay โดยต้อง aggregate beta amyloid 1-42 ก่อนโดยนำไปบ่มในตู้บอดูอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำสารสกัดมะพร้าวและหมากเม่า ที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น (0.1 – 100 μ g/ml) และ aggregated beta amyloid 1-42 มาบ่มกับเซลล์ในถาดเพาะเลี้ยง 96

หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบความสามารถในการป้องกันการทำลายเซลล์โดยตรวจวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ด้วยวิธี MTT reduction assay

2.6 ศึกษาฤทธิ์ในการเพิ่มและฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำของสารสกัดหมากเฒ่าและมะปรางในสัตว์ทดลอง

ฤทธิ์ของสารสกัดจากผลหมากเฒ่าและผลมะปรางในชั้น เอทานอล ต่อการป้องกันการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ Scopolamine ในหนูเมาส์ ได้ถูกทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา water maze สำหรับวัดผล long-term memory และ modified Y-maze สำหรับวัดผล short-term memory หนูเมาส์ เพศผู้ พันธุ์ ICR อายุ 6 สัปดาห์ น้ำหนัก 30- 40 กรัม ถูกเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ อยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น และมีการควบคุมการเปิด-ปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง (12 ชม. Light-dark cycle) โดยให้หนูอยู่ในกรงขนาดกว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 175 x 245 x 125 มิลลิเมตร จำนวน 5 ตัวต่อกรง ให้น้ำและอาหาร และมีการเปลี่ยนวัสดุรองนอนให้หนูสัปดาห์ละ 2 ครั้ง หลังจากนั้น แบ่งหนูเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว และป้อนสารสกัดทางปากให้หนูในปริมาตร 0.2 – 0.4 ml ขึ้นกับน้ำหนักตัวหนู วันละ 1 ครั้ง ทุกวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนการทดสอบ โดยหนูแต่ละกลุ่มได้รับยาดังนี้

กลุ่ม 1 กลุ่มควบคุมปกติ ได้รับน้ำ 10 ml/kg จำนวน 10 ตัว

กลุ่ม 2 กลุ่มควบคุมที่มีภาวะความจำบกพร่อง ได้รับน้ำ 10 ml/kg จำนวน 10 ตัว

กลุ่ม 3 กลุ่มสารมาตรฐาน ได้รับ Tacrine ขนาด 10 มก/กก จำนวน 10 ตัว

กลุ่ม 4 กลุ่มทดสอบที่ได้รับสารสกัดหมากเฒ่าชั้น เอทานอล ขนาด 250 มก/กก จำนวน 10 ตัว

กลุ่ม 5 กลุ่มทดสอบที่ได้รับ สารสกัดมะปรางชั้น เอทานอล 250 มก/กก จำนวน 10 ตัว

2.6.1 ผลของสารสกัดหมากเฒ่าและมะปรางต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำโดยวิธี Water maze test

เมื่อป้อนสารทดสอบหนูเป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้ว ทดสอบความสามารถของสารสกัดต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ โดยป้อนสารสกัดทางปากให้หนู ก่อนทดสอบด้วย water maze 90 นาที จะทดสอบการเรียนรู้จดจำตำแหน่งของแผ่นรอง (platform) โดยให้ หนูว่ายน้ำในอ่างน้ำ เพื่อหาแผ่นรอง ที่เอาไว้นิพักเหนื่อย ซึ่งวางไว้ใต้ระดับน้ำ 1 cm โดยอ่างน้ำจะถูกแบ่งเป็น 4 ส่วน หนูจะถูกปล่อยลงอ่างน้ำโดยปล่อยหนูให้หันหน้าเข้าหาอ่างและปล่อยในส่วนที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ จับเวลาที่หนูใช้ในการหาแผ่นรองในแต่ละส่วน (Escape latency time) ถ้าครบ 60 วินาทีแล้วหนูยังหาแผ่นรองไม่เจอ ให้จับหนูมาวางบนแผ่นรองเป็นเวลา 15 วินาที เมื่อหนูว่ายน้ำจนครบ 4 ส่วนแล้ว ให้จับหนูออกและเช็ดหนูให้แห้ง และนำหนูเข้ากรง โดยทดสอบติดต่อกัน 4 วัน ประเมินความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำโดยการเปรียบเทียบระยะเวลาในการหาตำแหน่งของแผ่นรองของกลุ่มสารทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ

2.6.2 ผลของสารสกัดหมากเฒ่าและมะปรางต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ Scopolamine โดยวิธี Water maze test

เมื่อป้อนสารทดสอบหนูเป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้ว เริ่มการทดลองโดยการฝึกหนูว่ายน้ำ (Training period) ในอ่างน้ำ ที่ถูกแบ่งเป็น 4 ส่วนและมีแผ่นรองอยู่ในส่วนที่ 1 หนูแต่ละตัวได้ถูกฝึกให้ว่ายน้ำทุกวันติดต่อกัน 4 วัน โดยในแต่ละวันปล่อยหนูให้ว่ายน้ำในอ่างน้ำในส่วนที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับเป็นเวลา 60 วินาที จับเวลาที่หนูใช้ในการหาแผ่นรองในแต่ละส่วน (Escape latency time) ฝึกจนเวลาที่ใช้ในการหาแผ่นรองคงที่ (4 วัน) หลังจากนั้นทดสอบติดต่อกันอีก 3 วัน (Test period) โดยในวันทดสอบ ได้ป้อนสารสกัดทางปากให้หนูก่อนเป็นเวลา 60 นาที

หลังจากนั้นจะฉีดสโคโปลามีน 1 มก/กก หรือ normal saline เข้าทางช่องท้อง (i.p.) ก่อนทดสอบด้วย water maze 30 นาทีโดยหนูแต่ละกลุ่มได้รับสารดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงสถานะที่ใช้ในการให้สารทดสอบในหนูแต่ละกลุ่ม

กลุ่มที่	Treatment
กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมปกติ	น้ำ 10 ml/kg + Normal Saline
กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุมที่มีภาวะความจำบกพร่อง	น้ำ 10 ml/kg + scopolamine 1 มก/กก
กลุ่มที่ 3 กลุ่มสารมาตรฐาน	Tacrine 10 มก/กก + scopolamine 1 มก/กก
กลุ่มที่ 4 กลุ่มสารทดสอบ	สารสกัดหมากเฒ่าชั้น เอทานอล 250 มก/กก + scopolamine 1 มก/กก
กลุ่มที่ 5 กลุ่มสารทดสอบ	สารสกัดมะปรางชั้น เอทานอล 250มก/กก + scopolamine 1 มก/กก

หมายเหตุ การบริหารยา Normal Saline และ scopolamine จะให้โดยการฉีดผ่านทางช่องท้องของหนูทดลอง (intraperitoneal, i.p.) ในปริมาตร 0.2 – 0.4 ml ขึ้นกับน้ำหนักตัวหนู บริเวณที่ฉีด left posterior quadrant of the abdomen ส่วน น้ำ, tacrine สารสกัดหมากเฒ่าและมะปราง จะบริหารยาโดยการป้อนทางปากในปริมาตร 0.2 – 0.4 ml ขึ้นกับน้ำหนักตัวหนู วันละ 1 ครั้ง โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียม คือ น้ำ

ประเมินความสามารถในการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องโดยการเปรียบเทียบระยะเวลาในการหาตำแหน่งของแผ่นรองของกลุ่มสารทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำให้ความจำบกพร่องโดย scopolamine

2.6.3 ผลของสารสกัดหมากเฒ่าและมะปรางต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากรับ Scopolamine โดยวิธี Modified Y-maze

เมื่อป้อนสารสกัดให้หนูเป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้ว ทดสอบผลของสารสกัดในการป้องกันการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากรับ Scopolamine โดยใช้โมเดลศึกษา Modified Y-maze ซึ่งเป็นโมเดล สำหรับวัดผล short-term memory โดยป้อนสารสกัดทางปากให้หนูก่อนเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นจึงฉีดสโคโปลามีนขนาด 1 มก/กก เข้าทางช่องท้อง (i.p.) ก่อนทดสอบด้วย Y-maze 30 นาที โดยหนูแต่ละกลุ่มได้รับสารดังนี้

กลุ่ม 1 กลุ่มควบคุมปกติ ได้รับน้ำ 10 ml/kg ร่วมกับ Normal Saline

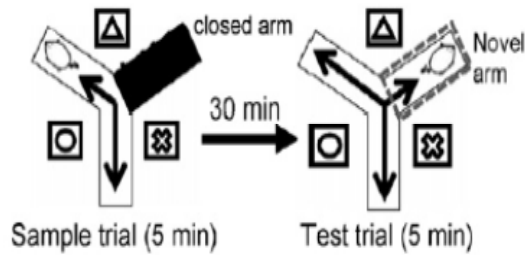
กลุ่ม 2 กลุ่มควบคุมที่มีภาวะความจำบกพร่อง ได้รับน้ำ 10 ml/kg ร่วมกับ scopolamine 1 มก/กก

กลุ่ม 3 กลุ่มสารมาตรฐาน ได้รับ Tacrine 10 มก/กก ร่วมกับ scopolamine 1 มก/กก

กลุ่ม 4 กลุ่มสารทดสอบ ได้รับสารสกัดหมากเฒ่า 250 มก/กก ร่วมกับ scopolamine 1 มก/กก

กลุ่ม 5 กลุ่มสารทดสอบ ได้รับสารสกัดมะปราง 250 มก/กก ร่วมกับ scopolamine 1 มก/กก

ทดสอบภาวะความจำเสื่อมของหนูทดลองโดยวิธี Modified Y-maze ใน Y-shape apparatus ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 อุปกรณ์ modified Y-maze

การทดสอบประกอบด้วย 2 phase คือ sample phase และ test phase โดยในช่วง sample phase ซึ่งปิดแขนหนึ่งแขนไว้ แล้วปล่อยหนูที่แขนด้านใดด้านหนึ่งของ Y-maze ปล่อยให้หนูสำรวจทำความคุ้นเคยกับสองแขนที่เปิดไว้ เป็นเวลา 5 นาที บันทึกจำนวนครั้งที่หนูเข้าไปสำรวจในแต่ละแขน หลังจากช่วง sample phase จะนำหนูคืนไว้ในกรงเป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะนำมาทดสอบในช่วง test phase ซึ่งแขนทั้ง 3 แขนถูกเปิดออก แล้วปล่อยหนูที่แขนด้านใดด้านหนึ่งของ Y-maze ปล่อยให้หนูสำรวจทั้งสามแขนที่เปิดไว้ เป็นเวลา 5 นาที บันทึกจำนวนครั้งที่หนูเข้าไปสำรวจในแต่ละแขน ประเมินความสามารถในการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำโดยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของจำนวนครั้งที่หนูอยู่ในแขนใหม่ (percentage of new arm entry) ของกลุ่มสารทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำให้ความจำบกพร่องโดย scopolamine

3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าในการต้านภาวะซึมเศร้าในหนูเม้าส์ปกติและหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าด้วยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ การคัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้า จะทำในหนูปกติ และ สารที่ให้ผลในการต้านซึมเศร้าที่ดีจะถูกคัดเลือกมาศึกษาต่อในแบบจำลองหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าด้วยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

3.1 ศึกษาคัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าในหนูเม้าส์ปกติ

3.1.1 คัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าโดยใช้แบบทดสอบ Tail suspension test (Screening for antidepressant activity) (Steru et. Al. 1985)

- 1) เลี้ยงหนูเม้าส์ โดยหนูที่ใช้ในการทดลองนี้จะเป็นหนูเม้าส์ เพศผู้ พันธุ์ ICR อายุ 8 สัปดาห์ แบ่งกลุ่มหนูที่เลี้ยงออกเป็น 10 กลุ่มๆละ 8-10 ตัวตามการได้รับยาดังนี้
 - 1.1) กลุ่มควบคุมปกติ ได้รับ vehicle
 - 1.2) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะพร้าว ขนาด 250 มก/กก
 - 1.3) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะพร้าว ขนาด 500 มก/กก
 - 1.4) กลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นมะพร้าว ขนาด 250 มก/กก
 - 1.5) กลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นมะพร้าว ขนาด 500 มก/กก
 - 1.6) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหมากเฒ่า ขนาด 250 มก/กก
 - 1.7) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหมากเฒ่า ขนาด 500 มก/กก
 - 1.8) กลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นหมากเฒ่า ขนาด 250 มก/กก

1.9) กลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นหมากเฒ่า ขนาด 500 มก/กก

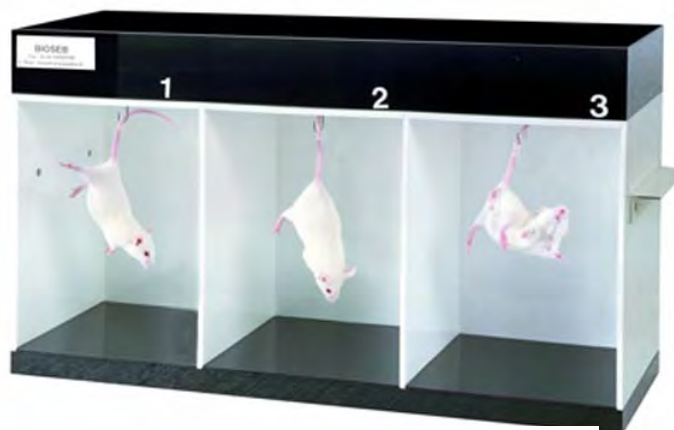
1.10) กลุ่มที่ได้รับ Imipramine ขนาด 25 มก/กก

กลุ่มควบคุมปกติ และกลุ่มที่ได้รับมะปร่างและหมากเฒ่า จะได้รับ vehicle , สารสกัด และน้ำคั้น โดยการป้อน ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับยาด้านซึมเศร้า Imipramine จะได้รับยาผ่านทางกรีดบริเวณช่องท้อง

กรงที่ใช้ในการทดลอง มีขนาด 175 x 245 x 125 มิลลิเมตร ทั้งหมด 20 กรง และขวดน้ำทั้งหมด 20ขวด โดยได้เลี้ยงหนูในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น และที่มีการควบคุมการเปิด-ปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง (12 ชม. Light-dark cycle) ให้น้ำและอาหาร เปลี่ยนวัสดุรองนอนให้หนูสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

2) Tail suspension test

หลังจากได้รับยาไปแล้ว 60 นาที หนูแต่ละตัวถูกนำมาทดสอบ tail suspension test ซึ่งการทดสอบนี้ จะเป็นแบบทดสอบที่นิยมใช้ในการตรวจสอบหรือคัดกรองฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้าของยา โดยภาวะเครียดที่เกิดขึ้นกับหนูเมาส์ คือการที่หนูถูกแขวนลอยอยู่ในอากาศในท่าทางที่ผิดปกติ คือเอาหัวห้อยลงมา หนูจะพยายามขยับตัว เพื่อหนี หรือให้หลุดพ้นจากการอยู่ในท่าทางแบบนั้น ดังนั้นหนูที่ไม่มีการเคลื่อนไหว หรือไม่พยายามหนี สามารถแปลผลได้จากที่ immobility time ที่สูงว่าหนูตัวนั้นมีพฤติกรรมซึมเศร้า แต่ถ้าในหนูที่ได้รับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน ค่า immobility time จะมีค่าน้อยมาก และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับหนูที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว การทดสอบทำได้โดยการนำเทปกาวพันติดที่หางของหนูเมาส์ ห่างจากปลายหางประมาณ 1 ซม. จากนั้นนำหนูไปแขวนในเครื่องมือ tail suspension apparatus ดังรูปที่ 2



Tail suspension test apparatus

รูปที่ 2 Tail suspension apparatus

จับเวลาทั้งหมด 6 นาที บันทึกค่า Immobility time ในช่วง 4 นาทีสุดท้าย ในหนูเมาส์ แต่ละตัว ได้บันทึกวิดีโอขณะทดลองด้วยทุกครั้ง และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมช่วยบันทึกเวลา

3.1.2 คัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าในหนูเมาส์ปกติ โดยใช้แบบทดสอบ forced swimming test (Screening for antidepressant activity) (Porsolt R.D. et al., 1979)

1) เลี้ยงหนูเมาส์ โดยหนูที่ใช้ในการทดลองนี้จะเป็นหนูเมาส์ เพศผู้ พันธุ์ ICR อายุ 8 สัปดาห์ แบ่งกลุ่มหนูที่เลี้ยงออกเป็น 10 กลุ่มๆละ 8-10 ตัวตามการได้รับยาดังนี้

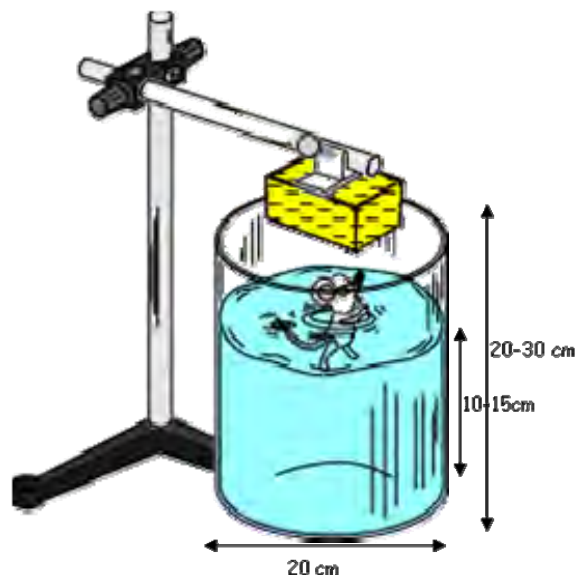
- 1.1) กลุ่มควบคุมปกติ ได้รับ vehicle
- 1.2) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะพร้าว ขนาด 250 มก/กก
- 1.3) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะพร้าว ขนาด 500 มก/กก
- 1.4) กลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นมะพร้าว ขนาด 250 มก/กก
- 1.5) กลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นมะพร้าว ขนาด 500 มก/กก
- 1.6) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหามกเมา ขนาด 250 มก/กก
- 1.7) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหามกเมา ขนาด 500 มก/กก
- 1.8) กลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นหามกเมา ขนาด 250 มก/กก
- 1.9) กลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นหามกเมา ขนาด 500 มก/กก
- 1.10) กลุ่มที่ได้รับ Imipramine ขนาด 25 มก/กก

กลุ่มควบคุมปกติ และกลุ่มที่ได้รับมะพร้าวและหามกเมา จะได้รับ vehicle , สารสกัด และน้ำคั้น โดยการป้อน ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับยาด้านซึมเศร้า Imipramine จะได้รับยาผ่านทางกรีดบริเวณช่องท้อง

กรงที่ใช้ในการทดลอง มีขนาด 175 x 245 x 125 มิลลิเมตร ทั้งหมด 20 กรง และขวดน้ำทั้งหมด 20 ขวด โดยได้เลี้ยงหนูในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น และที่มีการควบคุมการเปิด-ปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง (12 ชม. Light-dark cycle) ให้น้ำและอาหาร เปลี่ยนวัสดุรองนอนให้หนูสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

2) Forced swimming test

แบบจำลอง Forced swimming test เป็นแบบจำลองที่ใช้ทดสอบภาวะซึมเศร้าในหนูเมาส์ โดยการปล่อยหนูลงว่ายในถังน้ำแคบๆที่ไม่มีทางหนี หนูที่ไม่มีความพยายามว่ายน้ำหรือตะเกียกตะกายเพื่อหนีออกจากถังน้ำ จะมีค่า Immobility time สูง แต่ถ้าหนูที่ได้รับยาด้านซึมเศร้า จะมีค่า Immobility time ต่ำกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ก่อนทดสอบ forced swimming test 1 วัน จะต้องฝึกหนูให้ว่ายน้ำ โดยฝึกหนูว่ายน้ำในถังแก้วทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 ซม. สูง 22 ซม. ซึ่งบรรจุน้ำสูงประมาณ 10 ซม. เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้หนูเมาส์ ได้รู้สภาวะที่ไม่มีทางหนี ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 Forced swimming test

หลังจากการทำ pre test เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว ก็ทำ Forced swimming test หลังการให้ยา ไปแล้ว 30 นาที โดยวัดเป็นเวลาที่ไม่มีการเคลื่อนไหวหลังจากที่ปล่อยลงสู่ถังน้ำ เวลาที่หนูอยู่ในถังน้ำ คือ 6 นาที แต่จะจับเวลาในช่วง 4 นาทีสุดท้าย โดยบันทึกภาพวิดีโอตลอดการทดลองเพื่อสังเกตพฤติกรรมหนูแต่ละตัวที่ได้รับ treatment ที่ต่างกัน

3.1.3 การทดสอบ locomotor activity ในหนูปกติที่ได้รับสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่า ด้วยวิธี Y maze test

Y maze test แบบจำลองนี้จะทดสอบ locomotor activity เพื่อดูผลของยาว่ามีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity หรือไม่ ยาที่มีฤทธิ์ต้านซึมเศร้าจะไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity โดยปล่อยหนูลงไปที่ฐานของ maze รูปตัว Y นับจำนวนแขนที่หนูเดินใน Y Maze จับเวลา 5 นาที บันทึกผลเป็นจำนวนช่องที่หนูเดินใน Y Maze (number of arm entries)

3.2 ทดสอบผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดสะสมเป็นระยะเวลานาน ในแบบจำลองภาวะซึมเศร้าแบบ

Chronic mild stress

- 1) เลี้ยงหนูเมาส์ โดยหนูที่ใช้ในการทดลองนี้จะเป็นหนูเมาส์ เพศผู้ พันธุ์ ICR อายุ 4 สัปดาห์ แบ่งกลุ่มหนูที่เลี้ยงออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ
 - กลุ่มควบคุมปกติ จำนวน 10-12 ตัว
 - กลุ่มที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อน ติดต่อกันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ จำนวน 72 ตัว

กรงที่ใช้ในการทดลอง มีขนาด 175 x 245 x 125 มิลลิเมตร ทั้งหมด 12 กรง และขวดน้ำทั้งหมด 12 ขวด โดยได้เลี้ยงหนูในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น และที่มีการควบคุมการเปิด-ปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง (12 ชม. Light-dark cycle) ให้น้ำและอาหาร เปลี่ยนวัสดุรองนอนให้หนู

สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยเลี้ยงติดต่อกันเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ สังเกตและจดบันทึกพฤติกรรมของหนูที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ภาวะความเครียด ความก้าวร้าว ความดุ ความตื่นตระหนก ความสนใจต่อสิ่งต่างๆ รอบตัว เป็นต้น และบันทึกน้ำหนักหนู สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2) Unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures และ pre-sucrose consumption test (Willner P. et al., 1987 และ Li S. et al. 2008)

ก่อนที่จะแบ่งหนูออกเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับความเครียด จะต้องนำหนูเมาส์ทั้งหมดมาทดสอบการบริโภคสารละลายน้ำตาลซูโครสก่อน (sucrose consumption test) เพื่อเก็บเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับหนูแต่ละตัว การทำ sucrose consumption ทำได้โดย ให้หนูเมาส์อดอาหารและน้ำ ก่อนที่จะทดสอบ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นให้สารละลายน้ำตาลซูโครส 2% กับหนูเมาส์ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณปริมาณซูโครสที่หนูแต่ละตัวได้รับเข้าไปในช่วงเวลาดังกล่าว ทำซ้ำอย่างนี้เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำข้อมูลที่ได้มาจัดแบ่งกลุ่มหนูแบบสุ่มให้มีความแปรปรวนของข้อมูลการบริโภคสารละลายซูโครส 2% น้อยที่สุดในแต่ละกลุ่ม หนูกลุ่มควบคุมจะไม่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดความเครียด ส่วนหนูกลุ่มที่เป็น UCMS group จะได้รับสิ่งกระตุ้นต่างๆ ให้เกิดภาวะความเครียดสะสม การให้ความเครียดอย่างอ่อนประกอบด้วย การอดอาหารและงดน้ำ, การทำกรงเอียง 45°, การจำกัดการเข้าถึงอาหาร, การให้ขวดเปล่าที่ไม่บรรจุน้ำ, การจับหนูอยู่เป็นคู่, การให้เสียงรบกวน, การทำกรงเปียก, การให้ไฟแสงสว่างตลอดทั้งคืน, การกลับ light/dark cycle โดยกระตุ้นทั้งหมด 5 สัปดาห์ดังแสดงในตารางที่ 2 ต่อไปนี้

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะในการเลี้ยงหนูในการทดสอบ Unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures

	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Saturday	Sunday
Food and water deprivation (5hr)	06.00-11.00 —						
Sucrose preference (1hr)	11.00-12.00 —						
Water deprivation (16hr) x1						16.00-08.00 —	
45° cage tilt. (3hr)		08.00-11.00 —					
Limited access to food (12 hr) x1			19.00-07.00 —				
Continuous overnight illumination (12 hr) x1		19.00-07.00 —					
Overnight period in a soiled cage (12 hr) x1				19.00-07.00 —			
Reversed light/dark cycle (Fri-Mon)	06.00 —					18.00 —	
Ultrasonic sound (3hr) x2			13.00-16.00 —				11.00-14.00 —

โดยกระตุ้นทั้งหมด 5 สัปดาห์

1) การให้ยาในหนูเมาส์

หนูเมาส์ ถูกแบ่งกลุ่มการให้ยาที่แตกต่างกันดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะในการให้ยาที่แตกต่างกันในหนูแต่ละกลุ่มของการทดสอบ

Unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures

กลุ่มที่	Treatment
1. หนู nonstress	vehicle
2. หนู UCMS	vehicle
3. หนู UCMS	สารสกัดมะพร้าว 250 มก/กก
4. หนู UCMS	สารสกัดมะพร้าว 500 มก/กก
5. หนู UCMS	สารสกัดหมากเม่า 250 มก/กก
6. หนู UCMS	สารสกัดหมากเม่า 500 มก/กก
7. หนู UCMS	Imipramine 25 มก/กก

หนูเมาส์ จะเริ่มได้รับยาตั้งแต่วันที่ 22 ถึงวันที่ 35 ของการทำ Chronic mild stress และจะบริหารยาโดยการฉีดเข้าช่องท้องในช่วงเวลา 9.00-11.00 น. ในวันสุดท้ายของการให้ยา จะทดสอบการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการบริโภคซูโครส

2) Sucrose consumption test

ก่อนที่จะทดสอบจะต้องให้หนูอดอาหารและน้ำก่อนเป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นให้สารละลายน้ำตาลซูโครส 2% กับหนูเมาส์ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณปริมาณซูโครสที่หนูเมาส์แต่ละตัวได้รับเข้าไปในช่วงเวลาดังกล่าว เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างหนู nonstress, หนูที่ได้รับ CMS และหนูที่ได้รับ CMS+สารสกัดหมากเม่า และ CMS+สารสกัดมะพร้าว ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร นอกจากนี้ให้เปรียบเทียบผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงการบริโภคสารละลายซูโครสเทียบกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน

3) ทดสอบ Forced swimming test ในหนูเมาส์ที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

แบบจำลอง Forced swimming test เป็นแบบจำลองที่ใช้ทดสอบภาวะซึมเศร้าในหนูเมาส์ โดยการปล่อยหนูเมาส์ลงว่ายน้ำในถังน้ำแคบๆที่ไม่มีทางหนี หนูเมาส์ที่ไม่มีความพยายามว่ายน้ำ หรือตะเกียกตะกายเพื่อหนีออกจากถังน้ำ จะมีค่า Immobility time สูง แต่ถ้าหนูที่ได้รับยาด้านซึมเศร้า จะมีค่า Immobility time ต่ำกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ก่อนการทดสอบ forced swimming test 1 วัน จะต้องฝึกหนูเมาส์ให้ว่ายน้ำ ในถังแก้วทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง

20 ซม. สูง 22 ซม. ซึ่งบรรจุน้ำสูงประมาณ 10 ซม. เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้หนูเมาส์ ได้รู้สภาวะที่ไม่มีทางหนี หลังการให้ยาไปแล้ว 30 นาทีแล้วทดสอบพฤติกรรมหนู

- Forced swimming test โดยวัดเป็นเวลา 4 นาทีที่หนูเมาส์ไม่มีการเคลื่อนไหวหลังจากที่ปล่อยลงสู่ตื้นน้ำ เวลาที่หนูอยู่ในตื้นน้ำ คือ 6 นาที แต่จะจับเวลาในช่วง 4 นาทีสุดท้าย โดยจะบันทึกภาพวิดีโอตลอดการทดลองเพื่อสังเกตพฤติกรรมหนูแต่ละตัวที่ได้รับ treatment ที่ต่างกัน

4) Tail suspension test ในหนูเมาส์ที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

หลังจากได้รับยาไปแล้ว 60 นาที หนูแต่ละตัวถูกนำมาทดสอบ tail suspension test การที่หนูถูกแขวนลอยอยู่ในอากาศในท่าทางที่ผิดปกติ คือเอาหัวห้อยลงมา หนูจะพยายามขยับตัวเพื่อหนี หรือให้หลุดพ้นจากการอยู่ในท่าทางแบบนั้น ดังนั้นหนูที่ไม่มีการเคลื่อนไหว หรือไม่พยายามหนี สามารถแปลผลได้จากที่ immobility time ที่สูงว่าหนูตัวนั้นมีพฤติกรรมซึมเศร้า แต่ถ้าในหนูที่ได้รับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน ค่า immobility time จะมีค่าน้อยมาก และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับหนูที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว การทดสอบทำได้โดยการนำเทปขาวพันติดที่หางของหนูเมาส์ ห่างจากปลายหางประมาณ 1 ซม. จากนั้นนำหนูไปแขวนในเครื่องมือ tail suspension apparatus

จับเวลาทั้งหมด 6 นาที บันทึกค่า Immobility time ในช่วง 4 นาทีสุดท้าย ในหนูเมาส์แต่ละตัว บันทึกวิดีโอขณะทดลองด้วยทุกครั้ง และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมช่วยบันทึกเวลา

3.3 ศึกษาผลของสารสกัดต่อการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันโดยศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation โดยวิธี thiobarbituric acid assay ในหนูเมาส์ที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

3.3.1 ความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งขบวนการเกิด lipid peroxidation ของเซลล์สมองถูกทดสอบโดยวิธี thiobarbituric acid assay เมื่อทดสอบพฤติกรรมเสร็จแล้ว หลังจากนั้นหนึ่งชั่วโมง หนูเมาส์จะถูกฆ่า โดยการ perfusion ด้วยน้ำเกลือเข้าที่ตับ หรือหัวใจ เพื่อไล่และล้างเลือดออกจากตัวสัตว์ให้หมดหรือมากที่สุด จากนั้นเก็บตัวอย่างสมอง (whole brain exclude cerebellum) และเก็บตัวอย่างไว้ที่ -80°C ขบวนการเกิด lipid peroxidation จะถูกประเมินโดยการวัดปริมาณของ malondialdehyde ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการ lipid oxidation ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้โดยการทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid ได้สารสีม่วงเกิดขึ้น จากนั้นวัดปริมาณโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 540 nm ปริมาณ malondialdehyde ที่เกิดขึ้นสามารถคำนวณเทียบได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย malondialdehyde และจะต้องวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford เทียบกับ bovine serum albumin ด้วย ในทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

วิธีการนี้อาศัยหลักการที่สารประกอบโปรตีนในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับสาร Coomassie brilliant blue G-250 ในสภาวะที่เป็นกรด แล้วทำให้สารละลายเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 595 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสง ของโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ BSA สำหรับทำกราฟมาตรฐานดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ BSA

Concentration of BSA (mg/ml)		0	0.2	0.4	0.8
BSA stock solution (2mg/ml)	ul	0	5	10	20
Water	ul	50	45	40	30
Bradford reagent	ml	2.5	2.5	2.5	2.5

และเตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ดังแสดงข้างล่างนี้

Brain homogenate	4 ul
Water	46 ul
Bradford reagent	2.5 ml

ความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง = $[(\text{Abs}_{595} - b)/m] \times (50/4)$

เมื่อสมการของเส้นกราฟมาตรฐานเป็น $y = mx+b$

หมายเหตุ Bradford reagent เตรียมได้จากการเจือจางสารละลาย Concentrate Protein Assay (BioRad®) ในอัตราส่วนดังนี้

Concentrate Protein Assay : water = 1:4

3.4 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of BDNF, และ CREB ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า

เมื่อทดสอบพฤติกรรมเสร็จแล้ว หลังจากนั้น หนึ่งชั่วโมง หนูเมาส์จะถูกฆ่า โดย Cervical dislocation เพียงครั้งเดียวให้ตายทันที เพื่อลดความเจ็บปวดทรมานของสัตว์ทดลอง หลังจากนั้นตัดเส้นเลือดใหญ่บริเวณลำคอสัตว์ทดลองทันที เพื่อไล่และล้างเลือดออกจากตัวสัตว์ให้หมดหรือมากที่สุด จากนั้นเก็บรักษาสมอง ส่วน hippocampus ของหนูเมาส์ทุกตัว ไว้ที่ -80°C สำหรับการเตรียม total RNA, ทำ PCR product และ run gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า เช่น BDNF และ CREB gene โดยเปรียบเทียบกับแสดงออกของ house keeping gene ; b-actin ในแต่ละตัวอย่าง

3.4.1 Total RNA extraction

Homogenize tissue samples ใน TRIZOL reagent ปริมาตร 1 มล. จากนั้นเติม 0.2 ml ของ chloroform ลงไปและปั่นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง $12,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที สารละลายผสมจะแยกออกเป็นสองชั้น จากนั้น ปิเปตส่วนใสด้านบนอย่างระมัดระวังใส่ใน tube อันใหม่. เติม 0.5 ml ของ isopropyl alcohol ต่อ 1 ml of TRIZOL Reagent บ่มตัวอย่างที่ $15 - 30^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง $12,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจะได้ตะกอนของ RNA ซึ่งมีลักษณะคล้าย gel-like pellet ตกอยู่

ด้านล่างของ tube ค่อยๆเทส่วน supernatant ออกแล้วล้างตะกอน RNA ด้วย 75% เอทานอล 1 ml เขย่าผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 x g เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างตะกอนซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ปลอ่ยให้ตะกอน RNA แห้ง แล้วละลาย RNA pellet ด้วย 40 µl RNase free water เก็บรักษา RNA stock solution ที่ -20 °C

3.4.2 Reverse transcription

Pipette 2 µl ของ 0.5 µg/µl RNA sample ใส่ใน nuclease-free microcentrifuge tube จากนั้นเติม 1 µl oligo (dT) 12-18 mers, 4 µl 10 mM dNTP Mix (10 mM each dATP, dGTP, dCTP and dTTP at neutral pH) และ RNase free water ปรับให้ได้ปริมาตร 10 µl นำสารผสมที่ได้ส่งลงไปเครื่อง PCR ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °C for 5 min แล้วเก็บใส่ใน ice box จากนั้นเติม 4 µl 5X First-Strand Buffer, 2 µl 0.1 M DTT, 0.2 µl RNase Inhibitor, 0.8 µl RNase free water และ 1 µl (200 units) of M-MLV R ผสมให้เข้ากัน นำไป Incubate 50 min at 37 °C และ inactivate the reaction by heating at 70 °C for 15 min.

ตารางที่ 5 Summary of the primer pair for house keeping gene (β -actin), stress-related genes (BDNF, CREB) and product length.

Gene	Primer Sequence	Product length
	Top line : forward primer	
	Bottom line : reverse primer	
β -actin	5'-AAC GGT CTC ACG TCA GTG TA-3' 5'-GTG ACA GCA TTG CTT CTG TG-3'	220 bp
BDNF	5'-GAC AAG GCA ACT TGG CCT AC-3' 5'-CCT GTC ACA CAC GCT CAG CTC-3'	334 bp
CREB	5'-TAC CCA GGG AGG AGC AAT AC-3' 5'-GAG GCA GCT TGA ACA ACA AC-3'	183 bp

3.4.3 Semi-quantitative RT-PCR

The PCR reaction mixture ประกอบด้วย 1 µl of cDNA, 4 µl of 5x PCR buffer, 2 µl of deoxynucleoside triphosphate mixture, 2 µl of แมกนีเซียม chloride, 2 µl of primer pair (Table 5) , 0.4 µl of Taq polymerase และ 8.6 µl of distilled water ปริมาตรรวมทั้งสิ้น 20 µl. นำไปใส่เครื่อง PCR แล้วตั้งโปรแกรม preheating cycle at 95 °C เป็นเวลา 2 min, แล้วทำ PCR cycle จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย denaturation 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing 60 °C เป็นเวลา 1 นาที, elongation 72°C เป็นเวลา 2 นาที และ extension step ต่อที่ 72°C อีกเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ PCR products ไป run acrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide นำไปวิเคราะห์และถ่ายรูป photographed under UV light and analyzed by GeneSnap and Gene Tools Match Software

3.5 ขั้นตอนและวิธีการในการวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างหนูเมาส์ปกติและหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้า และเปรียบเทียบผลการรักษาภาวะซึมเศร้าระหว่างสารสกัด และยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน ทั้งในด้านการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การแสดงออกของยีน และภาวะเครียดออกซิเดชันข้อมูลถูกแสดงเป็น Mean $\pm$ S.E.M. และวิเคราะห์สถิติโดยใช้ t-test ระหว่างกลุ่ม non-stress group และ UCMS group และใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) เพื่อหาความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่ม แล้วตามด้วย Student–Newman–Keuls test ถ้าค่า $p < 0.05$ ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. การวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี

4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ ทองแดง, เหล็ก, สังกะสี, ลิเทียม, แคลเซียม, แมกนีเซียม, ซีลีเนียม และ ตะกั่ว โดยวิธี Atomic Absorption Spectroscopy

4.1.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ตัวอย่างของส่วนสกัดจากน้ำคั้นสดและจากการหมักด้วย 95% เอทานอล จะถูกนำมาเตรียมเป็นสารละลายโดยการย่อยด้วยสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น 65 % พร้อมกับใช้ความร้อนช่วย จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ตามสภาวะดังแสดงในตารางที่ 6

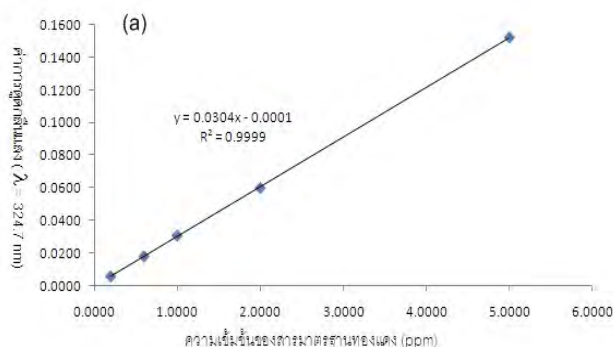
ตารางที่ 6 สภาวะของเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ทองแดง, เหล็ก, สังกะสี, ลิเทียม และ ตะกั่ว

สภาวะที่ใช้	แร่ธาตุที่วิเคราะห์							
	ทองแดง	เหล็ก	สังกะสี	ลิเทียม	แคลเซียม	แมกนีเซียม	ซีลีเนียม	ตะกั่ว
ลักษณะการวิเคราะห์ (mode)	Absorption	Absorption	Absorption	Absorption	Absorption	Absorption	Absorption	Absorption
ความยาวคลื่น (wavelength: nm)	324.8	248.5	213.9	671.3	422.7	285.2	196.0	217.0
เชื้อเพลิงที่ใช้	air-acetylene	air-acetylene	air-acetylene	air-acetylene	air-acetylene	air-acetylene	air-acetylene	air-acetylene

4.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน กราฟมาตรฐานและการวิเคราะห์หาปริมาณ

สารละลายมาตรฐานของทองแดง

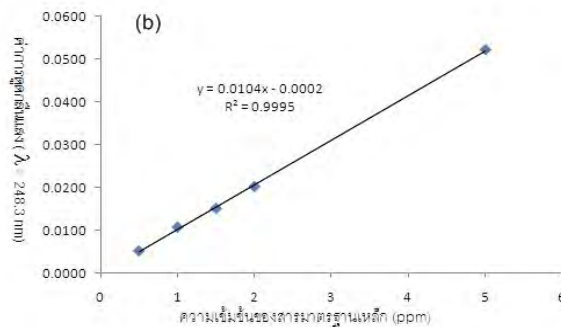
จาก stock standard solution ของ ทองแดง (AAS grade, Ajax[®]) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.2, 0.6, 1.0, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมมาทั้งหมดนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 324.8 นาโนเมตร นำผลการวัดที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 4) และนำไปคำนวณหาปริมาณ ทองแดง ที่มีในสารสกัดของมะปรางและหมากเฒ่า



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานทองแดง

สารละลายมาตรฐานของ เหล็ก

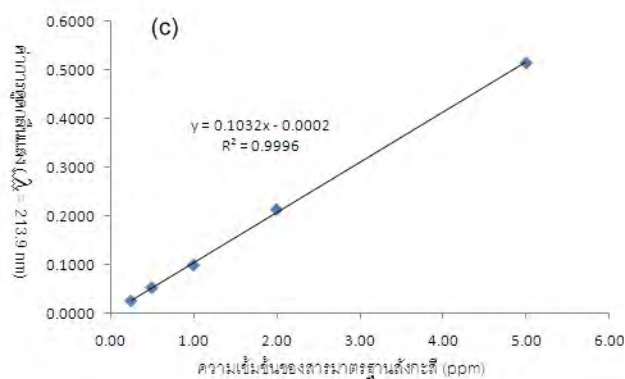
จาก stock standard solution ของ เหล็ก โดยเตรียมจากการชั่ง anhydrous เหล็ก chloride (FeCl_3 , Fluka[®]) นำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมมาทั้งหมดนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 248.5 นาโนเมตร นำผลการวัดที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 5) และนำไปคำนวณหาปริมาณ เหล็ก ที่มีในสารสกัดของมะปรางและหมากเฒ่า



รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเหล็ก

สารละลายมาตรฐานของสังกะสี

จาก stock standard solution ของ สังกะสี โดยเตรียมจากการชั่ง anhydrous สังกะสี chloride (ZnCl_2 , Fluka®) นำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมมาทั้งหมดนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 213.9 นาโนเมตร นำผลการวัดที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 6) และนำไปคำนวณหาปริมาณ สังกะสี ที่มีในสารสกัดของมะปรางและหมากเฒ่า

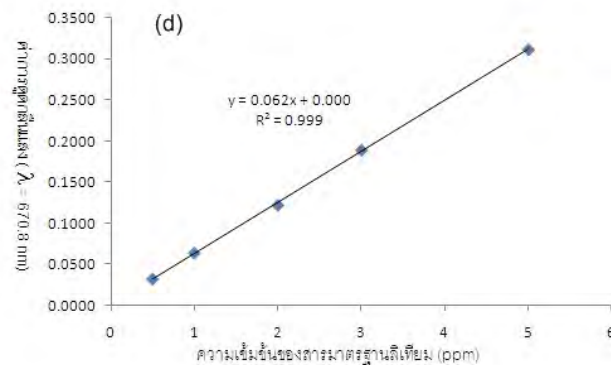


รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานสังกะสี

สารละลายมาตรฐานของลิเทียม

จาก stock standard solution ของ ลิเทียม (AAS grade, Ajax®) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมมาทั้งหมดนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 671.3 นาโนเมตร นำผลการวัดที่ได้ไปสร้างกราฟ

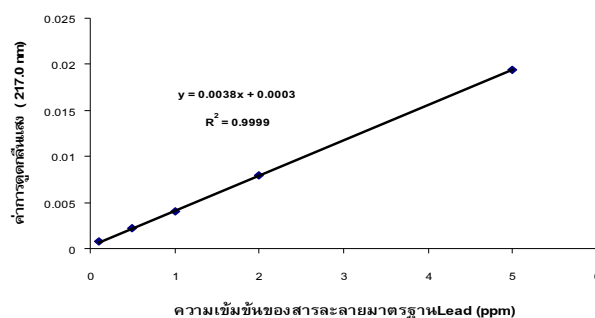
มาตรฐาน (รูปที่ 7) และนำไปคำนวณหาปริมาณ ลิเทียม ที่มีในสารสกัดของมะปรางและหมากเฒ่า



รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานลิเทียม

สารละลายมาตรฐานของตะกั่ว

จาก stock standard solution ของ ลิเทียม (AAS grade, Ajax[®]) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมมาทั้งหมดนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 217.0 นาโนเมตร นำผลการวัดที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 8) และนำไปคำนวณหาปริมาณ ลิเทียม ที่มีในสารสกัดของมะปรางและหมากเฒ่า

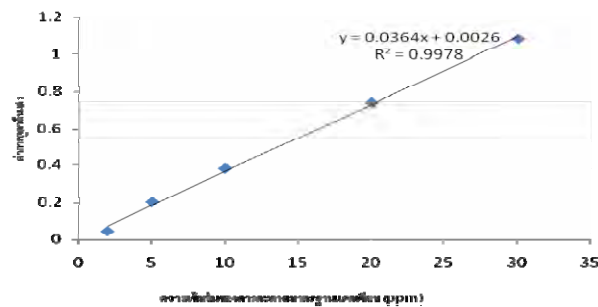


รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานตะกั่ว

สารละลายมาตรฐานของแคลเซียม

จาก stock standard solution ของ แคลเซียม โดยเตรียมจากการชั่ง แคลเซียม carbonate (CaCO_3 , Fluka[®]) นำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 2, 5, 10, 20 และ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมมาทั้งหมดนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption

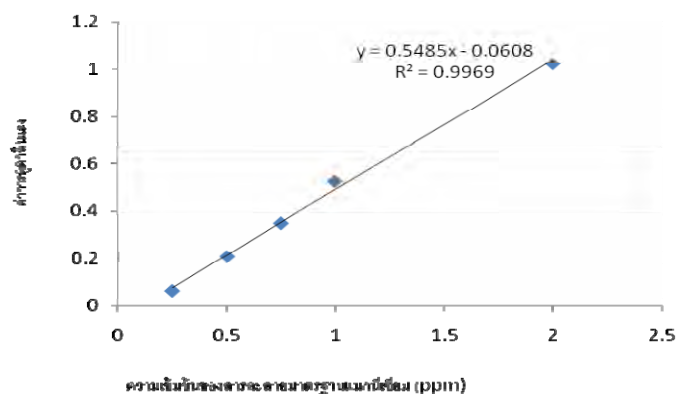
Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 422.7 นาโนเมตร นำผลการวัดที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 9) และนำไปคำนวณหาปริมาณ แคลเซียม ที่มีในสารสกัดของมะปรางและหมากเฒ่า



รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแคลเซียม

สารละลายมาตรฐานของแมกนีเซียม

จาก stock standard solution ของ แมกนีเซียม โดยเตรียมจากการชั่ง แมกนีเซียม chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Fluka®) นำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 และ 2.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมมาทั้งหมดนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 285.2 นาโนเมตร นำผลการวัดที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 10) และนำไปคำนวณหาปริมาณ แมกนีเซียม ที่มีในสารสกัดของมะปรางและหมากเฒ่า

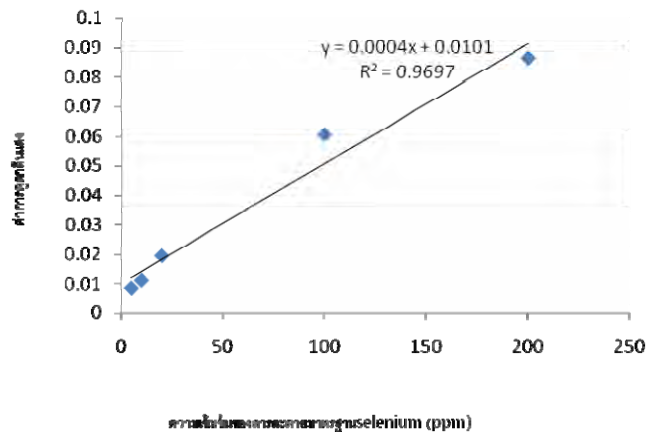


รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแมกนีเซียม

สารละลายมาตรฐานของซีลีเนียม

จาก stock standard solution ของ ซีลีเนียม (AAS grade, Ajax®) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 5, 10, 20, 100 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมมาทั้งหมดนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 196.0 นาโนเมตร นำผลการวัดที่ได้ไปสร้างกราฟ

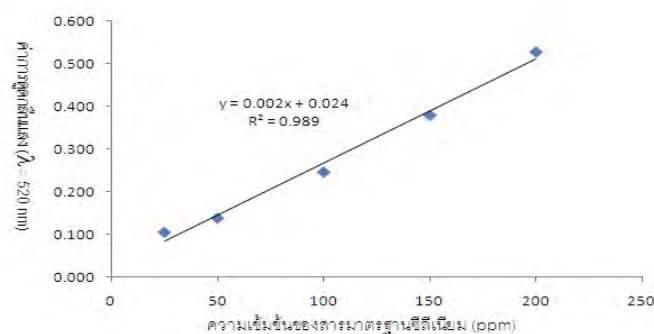
มาตรฐาน (รูปที่ 11) และนำไปคำนวณหาปริมาณ ซีลีเนียม ที่มีในสารสกัดของมะปรางและหมากเฒ่า



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ ซีลีเนียม โดยวิธี UV Spectrophotometry

เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้นของซีลีเนียม จาก ซีลีเนียมไดออกไซด์ (Sigma-Aldrich®) ให้ได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 1 มิลลิลิตร แล้วเติม conc. HCl ปริมาตร 4 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม 1.5% 2,4-DNPH-NEDA ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ด้วย น้ำปราศจากไอออน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 12) จากนั้นนำตัวอย่างจากสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าที่ผ่านการย่อยและเตรียมเป็นสารละลายมาทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง คำนวณหาปริมาณโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซีลีเนียม

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ โบรอนโดยใช้ชุดทดสอบ boron test kit

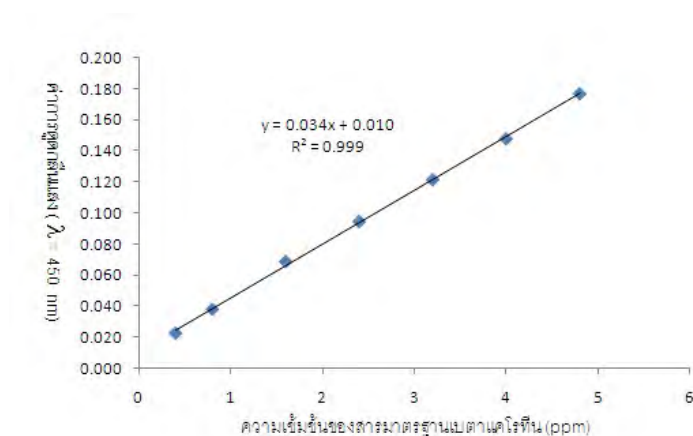
เนื่องจากวิธีการที่ใช้ในการทดสอบโดยเทคนิคทาง colorimetry ไม่สามารถตรวจพบปริมาณของ boron ได้ โดยพบว่าสีของสารสกัดมีการบดบังสีของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน จึงได้ปรับเปลี่ยนมาใช้ชุดทดสอบ boron test kit โดยอาศัยหลักการทางโฟเทนซีโอเมตรี

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (Total carotenoids) โดยวิธี UV-Spectrophotometry

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมโดยเทียบกับสารมาตรฐาน β -carotene และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

4.4.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

การเตรียม Stock standard solution ทำได้โดยชั่งสารมาตรฐาน β -carotene (Sigma-Aldrich®) 5 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 10 มิลลิตร จากนั้นนำสารละลายส่วนนี้ไปเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4.0 และ 4.8 ไมโครกรัม/มิลลิตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน β -carotene โดยวิธี UV spectrophotometry

4.4.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-spectrophotometer

ตัวอย่างที่ใช้จะใช้สารสกัดจากผลมะปรางและหมากเม่าทั้งในส่วนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ (95%เอทานอล) และส่วนน้ำคั้น ซึ่งสารสกัดทั้งสองส่วนนั้น จะมีขั้นตอนการเตรียมที่เหมือนกัน คือละลายด้วยเมทานอล 10 มิลลิตร แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และสามารถนำสารละลายดังกล่าวนี้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณ

4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ β -carotene โดยวิธี High performance liquid chromatography

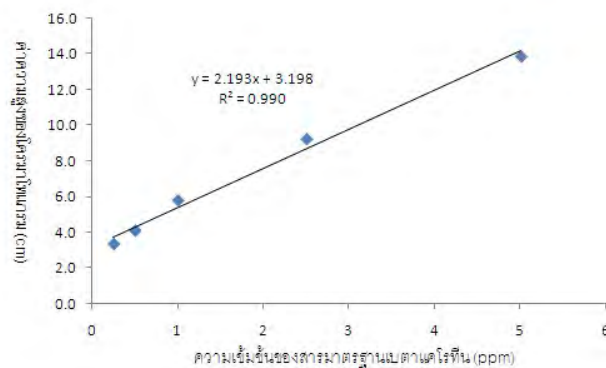
สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์หาปริมาณ β -carotene

- UV-visible detector (ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร)
- C18 column (Hypersil® ODS 4.0 x 250 mm)
- Mobile phase ประกอบด้วย เมทานอล : Acetonitrile (ACN) : Tetrahydrofuran (THF) (75:20:5)

- อัตราการไหลของ Mobile phase 1.0 มิลลิลิตร/นาที

4.5.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

เตรียม Stock solution โดยใช้สาร Standard β -carotene 5 มิลลิกรัม ละลายใน เมทานอล 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายส่วนนี้ไปละลายด้วย เมทานอล : acetonitrile : tetrahydrofuran ในอัตราส่วน 75:20:5 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายทั้งหมดไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC วัดความสูงของพีคที่ได้ จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 14) ระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับความสูงของพีค (แกน y)



รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน β -carotene โดยวิธี HPLC

4.5.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการหาปริมาณ β -carotene ด้วยเครื่อง HPLC

ตัวอย่างที่ใช้จะใช้สารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฒ่าทั้งสองส่วน นำมาละลายด้วย mobile phase ที่ใช้ในระบบของ HPLC คือ เมทานอล : ACN : THF (75:20:5) 10 มิลลิลิตร แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC คำนวณหาปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ผลการศึกษา

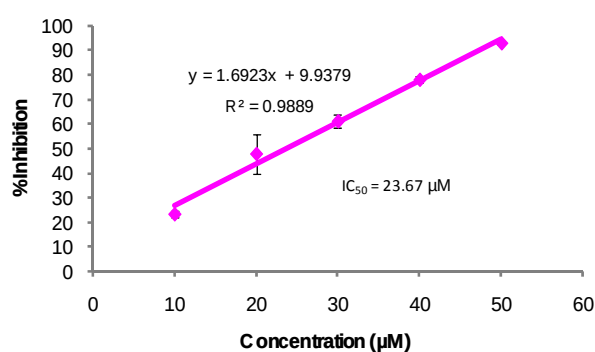
1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

จากการสกัดตัวอย่างผลมะปรางและหมากเฒ่าได้ร้อยละของปริมาณสารสกัด (%yield) จากทั้ง 2 วิธี ดังนี้คือ 1. จากส่วนของน้ำคั้น พบร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้เทียบกับน้ำหนักสดและทำให้แห้งด้วยวิธี freeze drying เท่ากับ 2.14 % (มะปราง) และ 4.03 % (หมากเฒ่า) 2. จากการสกัดด้วย 95% เอทานอลและทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator พบร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้เทียบกับน้ำหนักสด เท่ากับ 1.11 % (มะปราง) และ 0.06 % (หมากเฒ่า) และพบร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้เทียบกับน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 8.25 % (มะปราง) และ 6.24 % (หมากเฒ่า)

2. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อม วิธีการศึกษา

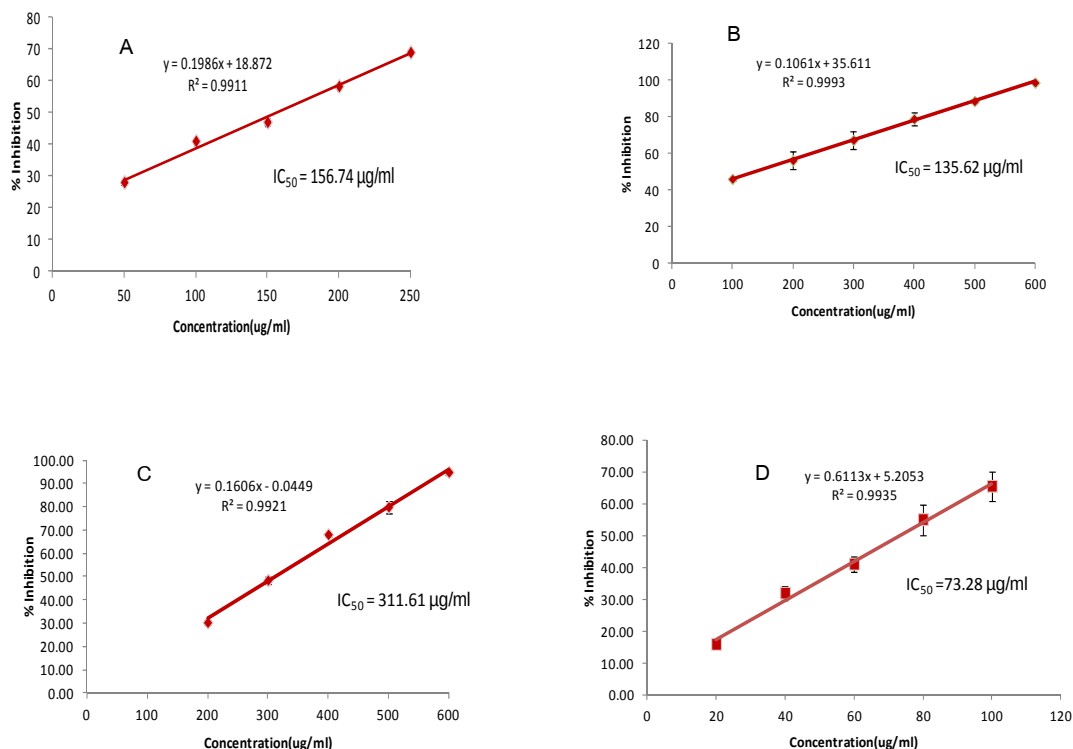
2.1 ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี ABTS assay

สารสกัดทั้งหมด 4 กลุ่มคือ น้ำคั้นจากผลหมากเฒ่า, สารสกัดหมากเฒ่าด้วย เอทานอล, น้ำคั้นจากผลมะปราง และ สารสกัดผลมะปรางด้วย เอทานอล รวมทั้ง trolox (positive control) ได้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay การทดสอบโดยวิธีนี้ได้ใช้อนุมูลอิสระ $ABTS^{+•}$ เป็นซับสเตรท ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยนำ ABTS มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระ โดยการออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น อนุมูล $ABTS^{+•}$ ที่สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดได้ถูกประเมินโดยวัดความสามารถในการ reduce อนุมูลอิสระ $ABTS^{+•}$ ซึ่งผลการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระจะแสดงเป็น %inhibition ซึ่งจากการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน trolox พบว่าความเข้มข้นของ trolox ที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50 % (IC_{50}) เท่ากับ 23.67 μM ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 ผลของ trolox ในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS assay. แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n=4).

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของน้ำคั้นและสารสกัดหมากเฒ่าและมะปราง โดยใช้ trolox ที่ความเข้มข้น 25 μM เป็น positive control พบว่าทั้งน้ำคั้นและสารสกัดหมากเฒ่าและมะปราง สามารถต้านฤทธิ์ออกซิเดชันได้ ดังแสดงในรูปที่ 16



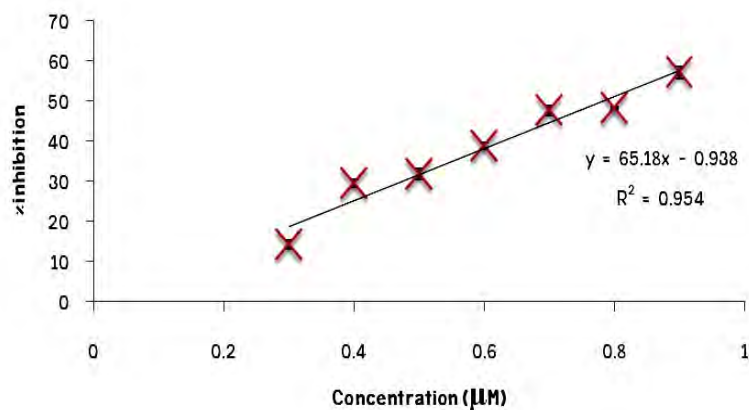
รูปที่ 16 ผลของสารสกัดหามกเมาและมะปรางในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS assay (A) น้ำคั้นหามกเมา (B) สารสกัดหามกเมาในชั้น เอทานอล (C) น้ำคั้นมะปราง (D) สารสกัดมะปรางในชั้น เอทานอล. แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n = 4).

จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด คือน้ำคั้นหามกเมา สารสกัดหามกเมาในชั้น เอทานอล, น้ำคั้นมะปรางและ สารสกัดมะปรางในชั้น เอทานอล พบว่าสารสกัดมะปรางในชั้น เอทานอล มีฤทธิ์แรงที่สุดด้วยค่า $IC_{50} = 73.28 \mu\text{g/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำคั้น และ สารสกัดในชั้น เอทานอล พบว่าทั้งสารสกัดมะปรางและหามกเมาในชั้น เอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นได้ดีกว่าน้ำคั้น

2.2 ผลของสารสกัดมะปรางและหามกเมาในการยับยั้งเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรสโดยวิธี modified Ellman's spectrophotometric method

การนำสารสกัดมะปรางและหามกเมา มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรส โดยวิธี Ellman's method เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรสโดยวัดจากปริมาณ 5-thio-2-nitrobenzoate ที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยาของ Acetylthiocholine iodide (ATCI) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น โดยมีเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรสเข้าทำปฏิกิริยา เกิดเป็น Thiocholine และ acetate เมื่อเติมสารละลาย DTNB เข้าไป จะเกิดการจับกับ Thiocholine เกิดเป็น 5-thio-2-nitrobenzoate ซึ่งมีสีเหลือง ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรสของสารมาตรฐาน tacrine พบว่าความเข้มข้นของ tacrine ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรสได้ 50 % (IC_{50}) เท่ากับ 0.83 μM ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 ผลของสารมาตรฐาน tacrine ต่อการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส

ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่า จึงใช้ tacrine ที่ความเข้มข้น 0.9 µM เป็น positive control ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสได้แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าต่อการยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส

สาร	% inhibition of AChE
Tacrine	54.83
น้ำคั้นจากผลหมากเฒ่า	5.97
สารสกัดหมากเฒ่าด้วย เอทานอล	3.98
น้ำคั้นจากผลมะปราง	16.48
สารสกัดผลมะปรางด้วย เอทานอล	17.90

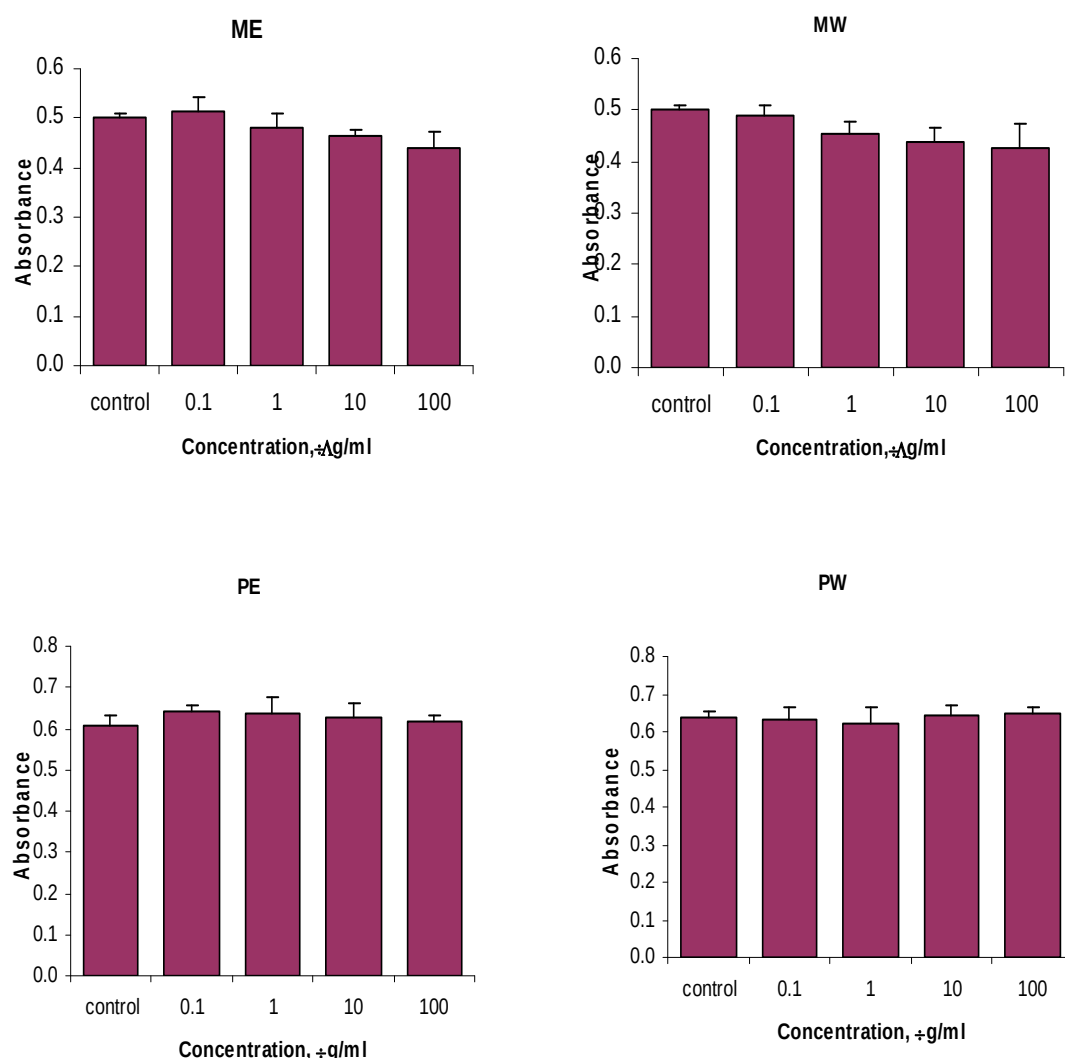
จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดหมากเฒ่าที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส ในขณะที่น้ำคั้นจากผลมะปราง และสารสกัดมะปรางด้วย เอทานอล ที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส ด้วยค่า %inhibition = 16.48 และ 17.90 ตามลำดับ

2.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าต่อเซลล์ประสาท

Neuroblastoma

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาท Neuroblastoma (NG108-15) โดยนำสารสกัดทั้ง 4 กลุ่มคือ น้ำคั้นจากผลหมากเฒ่า, สารสกัดหมากเฒ่าด้วย เอทานอล, น้ำคั้นจากผลมะปราง และ สารสกัดผลมะปรางด้วย เอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0 – 100 µg/mL) มาบ่มกับเซลล์ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทดสอบ

ความเป็นพิษของสารสกัด ด้วยวิธี MTT reduction assay ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมะปรางและหมากเม่า พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 100 $\mu\text{g/mL}$ ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาท แสดงดังรูปที่ 18



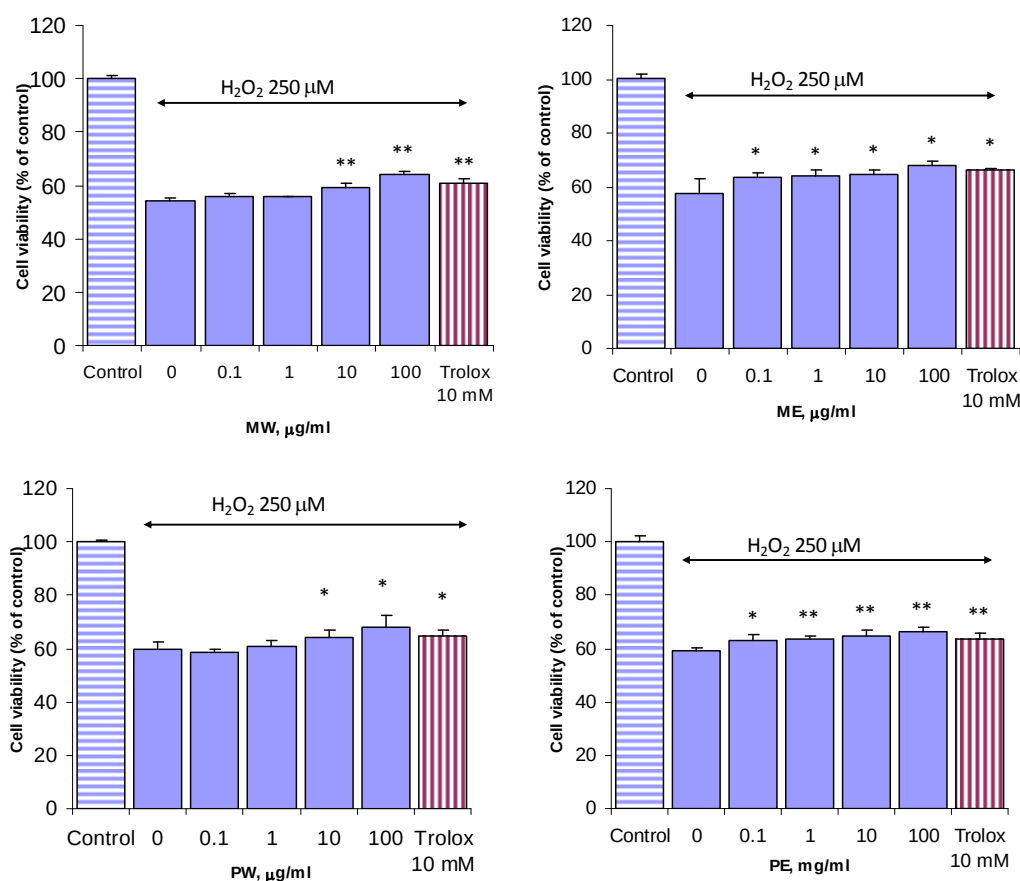
รูปที่ 18 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด 4 ชนิด: สารสกัดหมากเม่าด้วย เอทานอล (ME), น้ำคั้นจากผลหมากเม่า (MW), สารสกัดผลมะปรางด้วย เอทานอล (PE), น้ำคั้นจากผลมะปราง (PW)

2.4 ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเม่าในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องมาจาก Hydrogen peroxide โดยวิธี cell based assay

สารสกัดทั้งหมด 4 กลุ่มคือ น้ำคั้นจากผลหมากเม่า, สารสกัดหมากเม่าด้วยเอทานอล, น้ำคั้นจากผลมะปราง และ สารสกัดผลมะปรางด้วยเอทานอล รวมทั้ง trolox (positive control) ได้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องมาจาก Hydrogen peroxide โดยวิธี MTT reduction assay หลังจากบ่มเซลล์ประสาท Neuroblastoma (NG108-15) ด้วยสารสกัด หรือ สารมาตรฐาน 2 ชั่วโมง เซลล์จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress โดยการบ่มกับ Hydrogen peroxide

250 μM 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ของสารสกัด โดยตรวจวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT reduction assay

จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดในชั้นเอทานอล ทั้งจากผลมะปรางและหมากเฒ่ามีฤทธิ์แรงในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Hydrogen peroxide โดยพบว่าสารสกัดในชั้นเอทานอล ทั้งจากผลมะปรางและหมากเฒ่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ สามารถเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย Hydrogen peroxide เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 19) ในขณะที่น้ำคั้นจากผลมะปรางและหมากเฒ่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 $\mu\text{g/ml}$ จึงจะแสดงฤทธิ์ต้านการทำลายเซลล์ประสาทโดยเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย Hydrogen peroxide เพียงอย่างเดียว ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำคั้น และสารสกัดในชั้นเอทานอล พบว่าทั้งสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในชั้น เอทานอล มีฤทธิ์ป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ได้ดีกว่าน้ำคั้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้จาก cell culture เป็นไปในแนวทางเดียวกับผลต้านออกซิเดชั่นในหลอดทดลอง ดังนั้นฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ของสารสกัด อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น (antioxidant action) ของสาร

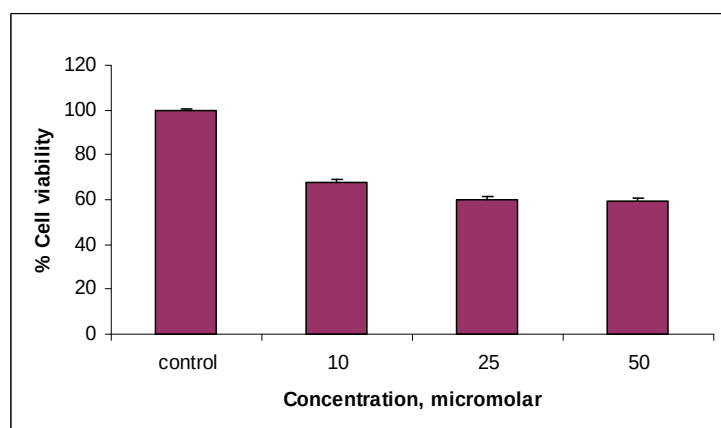


รูปที่ 19 ผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องมาจาก Hydrogen peroxide: น้ำคั้นจากผลหมากเฒ่า (MW), สารสกัดหมากเฒ่าด้วย เอทานอล (ME), น้ำคั้นจากผลมะปราง (PW), สารสกัดผลมะปรางด้วย เอทานอล (PE)

2.5 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid โดยวิธี cell based assay

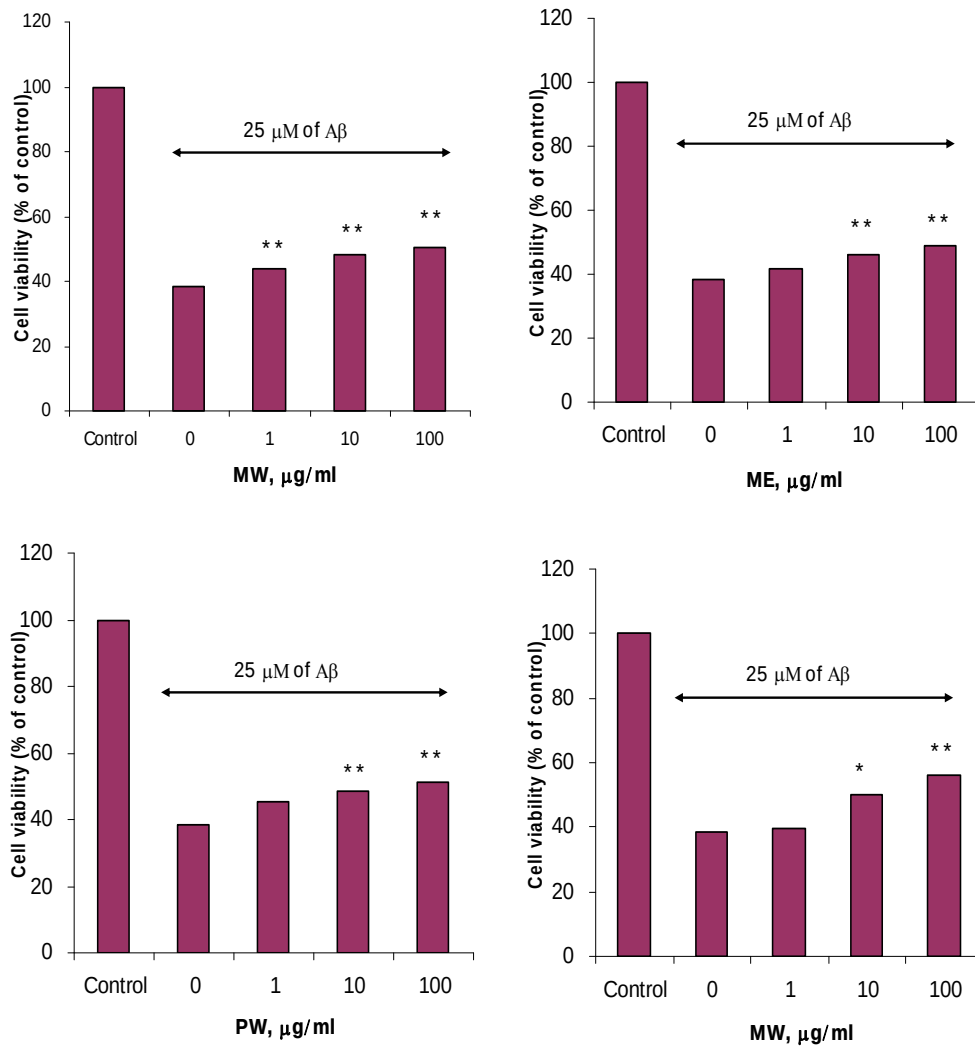
การสะสมของ beta amyloid plaque ในสมองส่วน hippocampus ถือเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ ดังนั้นถ้าสารใดสามารถป้องกันการเกิดพิษต่อเซลล์ของ beta amyloid ได้น่าจะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการช่วยชะลอการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ลงได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของสารสกัดหมากเฒ่าและมะพร้าวในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจาก beta amyloid

เมื่อบ่มเซลล์ C6 cell ด้วย aggregated beta amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า beta amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้น 25 μM สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ประมาณ 50% (รูปที่ 20) ดังนั้นจึงเลือก beta amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้น 25 μM เพื่อใช้สำหรับการทดสอบผลของสารสกัดต่อการป้องกันการทำลายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid โดยวิธี cell based assay ต่อไป



รูปที่ 20 ผลของ beta amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ C6

จากการทดลองนำสารสกัดทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ aggregated beta amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้น 25 μM มาบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดออกฤทธิ์ป้องกันการทำลายเซลล์โดย beta amyloid ได้ โดยพบว่าน้ำคั้นจากผลหมากเฒ่าตั้งแต่ความเข้มข้น 1 μM ขึ้นไปสามารถเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย aggregated beta amyloid 1-42 เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ สารสกัดที่เหลืออีก 3 ชนิด คือ สารสกัดหมากเฒ่าด้วย เอทานอล, น้ำคั้นจากผลมะพร้าว และ สารสกัดผลมะพร้าวด้วยเอทานอล สามารถเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย aggregated beta amyloid 1-42 เพียงอย่างเดียว ได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 10 μM ขึ้นไป ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจาก beta amyloid: น้ำคั้นจากผลหมากเฒ่า (MW), สารสกัดหมากเฒ่าด้วยเอทานอล (ME), น้ำคั้นจากผลมะพร้าว (PW), สารสกัดผลมะพร้าวด้วยเอทานอล (PE)

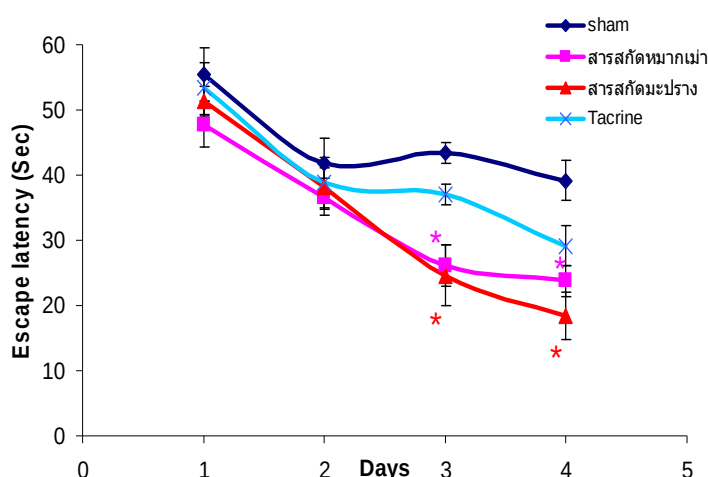
2.6 ศักยภาพในการเพิ่มและฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำของสารสกัดหมากเฒ่าและมะพร้าวในสัตว์ทดลอง

จากผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นโดยวิธีทางหลอดทดลอง (*In Vitro*) และ ในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) พบว่าสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าในชั้นเอทานอล มีฤทธิ์กำจัด free radical และมีฤทธิ์ป้องกันการ

ทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และ beta amyloid ได้ดีกว่าน้ำคั้น จึงได้เลือกสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในชั้นเอทานอลมาศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันโรค Alzheimer ต่อใน model สัตว์ทดลอง โดยได้ทดสอบฤทธิ์ในการเพิ่มและฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องจากได้รับ scopolamine ในหนูทดลอง โดยใช้โมเดลศึกษา คือ Morris Water Maze สำหรับวัดผล long-term memory และ modified Y-maze สำหรับวัดผล short-term memory

2.6.1 ผลของสารสกัดหมากเฒ่าและมะปรางต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำโดยวิธี Water maze test

ฤทธิ์ของสารสกัดหมากเฒ่าและมะปรางในชั้นเอทานอล ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ ถูกทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา Morris water maze หนูที่ได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 7 วันได้ถูกนำมาทดสอบการเรียนรู้จดจำตำแหน่งโดยให้หนูว่ายน้ำในอ่างน้ำ (water maze) แล้วให้หนูฝึกหาแผ่นรอง (platform) ที่เอาไว้นิพักเหนื่อย ประเมินความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำโดยการเปรียบเทียบระยะเวลาในการหาตำแหน่งของแผ่นรอง (Escape latency) ของกลุ่มสารทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ (sham) ผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในชั้น เอทานอล ขนาด 250 มก/กก สามารถกระตุ้นการเรียนรู้และความจำได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 3 และ 4 ของการทดสอบ (รูปที่ 22) ในขณะที่ tacrine ไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ



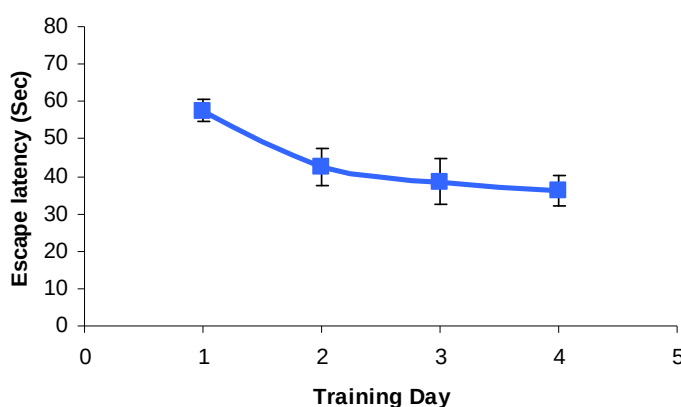
รูปที่ 22 ผลของ สารสกัดหมากเฒ่าและมะปรางในชั้นเอทานอล ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำโดยวิธี Water maze test. แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SEM (n = 10). * = p-value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ

2.6.2 ผลของสารสกัดหมากเฒ่าและมะปรางต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องจากได้รับ Scopolamine โดยวิธี Water maze test

ฤทธิ์ของสารสกัดหมากเฒ่าและมะปรางในชั้นเอทานอล ในการฟื้นฟูภาวะความจำและการเรียนรู้ที่บกพร่องในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย scopolamine ถูกทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา Morris water maze ซึ่งเป็นโมเดล สำหรับวัดผล long-term memory หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มี

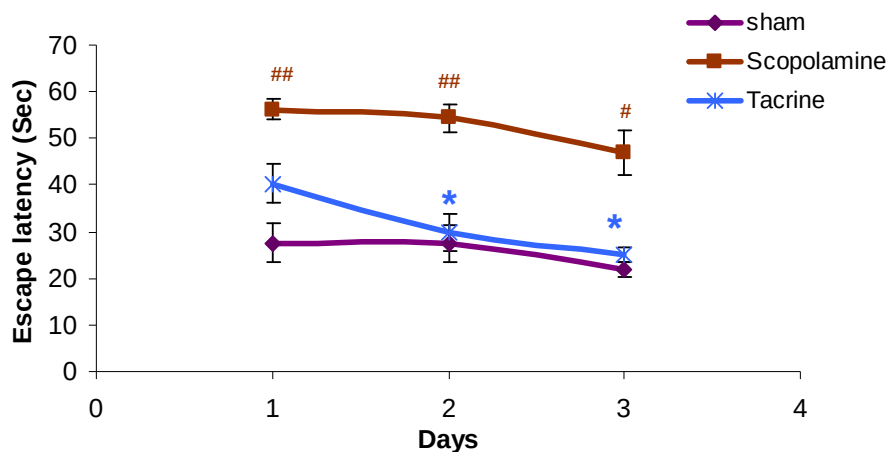
ภาวะการเรียนรู้และความจำบกพร่องโดย scopolamine และได้รับสารทดสอบได้ถูกนำมาทดสอบการเรียนรู้จดจำตำแหน่งโดยให้หนูว่ายน้ำในอ่างน้ำ (water maze) แล้วให้หนูฝึกหาแผ่นรอง (platform) ที่เอาไว้นั้นพักเหนื่อย ประเมินความสามารถในการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำโดยการเปรียบเทียบระยะเวลาในการหาตำแหน่งของแผ่นรอง (Escape latency) ของกลุ่มสารทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำให้ความจำบกพร่องโดย scopolamine

วิธีการทดลองนั้นใช้หนู ICR mice เพศผู้ที่ได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 7 วันมาฝึกให้เรียนรู้ที่จะว่ายน้ำไปยังแท่นยืนที่อยู่ใต้น้ำได้ โดยหนูถูกฝึก วันละ 4 รอบจนกระทั่งเวลาที่ใช้ในการหาแท่นยืนคงที่ เป็นเวลา 4 วัน ดังรูปที่ 23



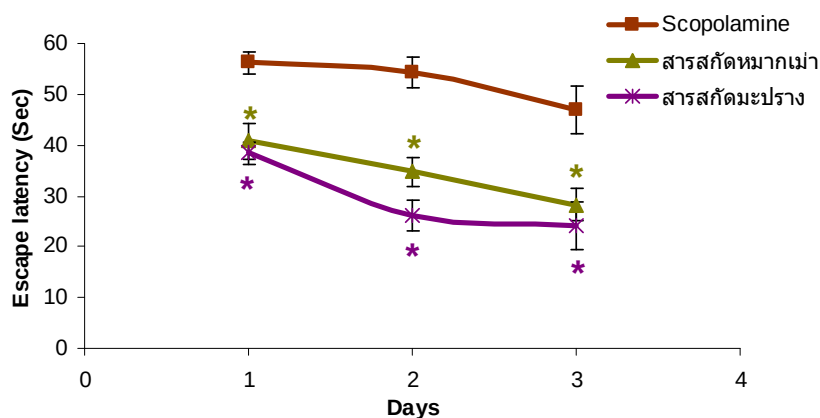
รูปที่ 23 กราฟแสดงเวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการหาแผ่นรองในช่วงการฝึกหนูให้ว่ายน้ำเพื่อเรียนรู้ตำแหน่งของแผ่นรอง

หลังจากนั้นทดสอบโดยหนูที่ถูกฝึกว่ายน้ำแล้วจะได้รับสารทดสอบ ก่อนที่จะฉีดตามด้วย Scopolamine เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำเสื่อมในสัตว์ทดลอง ในการทดลองนี้ได้มีการใช้ tacrine เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับ scopolamine เพียงอย่างเดียวใช้เวลาในการหาแผ่นรองนานกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (รูปที่ 24) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า scopolamine สามารถเหนี่ยวนำให้หนูมีภาวะความจำบกพร่องได้ เมื่อให้ tacrine ซึ่งเป็นสารมาตรฐานออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในขนาด 10 มก/กก ร่วมกับ scopolamine แก่หนูทดลอง พบว่าหนูใช้เวลาในการหาแผ่นรอง (Escape latency time) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่เกิดภาวะความจำเสื่อม ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 ผลของ Tacrine ต่อการฟื้นฟูเรียนรู้และความจำในการทดสอบ Morris water maze. แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SEM (n = 8). * = p-value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีภาวะความจำบกพร่อง # และ ## = p-value < 0.05 และ <0.01 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ.

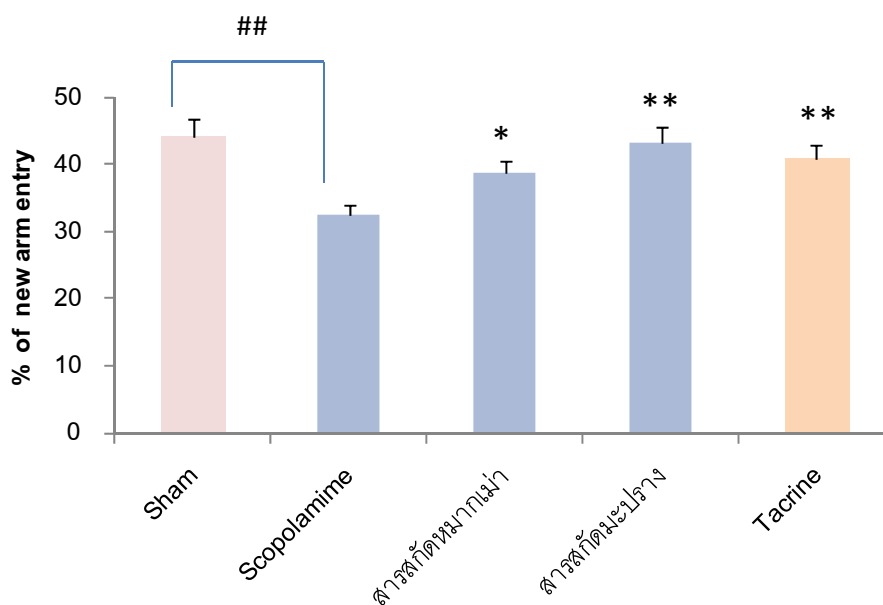
สำหรับหนูที่ได้รับสารสกัดหมากเฒ่า หรือ มะปรางในชั้นเอทานอล ในขนาด 250 μ g/kg สามารถลดเวลาในการหาแผ่นรอง (Escape latency time) ในการทดสอบ Morris water maze ของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่เกิดภาวะความจำเสื่อม (กลุ่ม scopolamine) รูปที่ 25 โดยสารสกัดจากผลมะปรางให้ผลในการป้องกันภาวะความจำเสื่อมได้ดีกว่าสารสกัดจากผลหมากเฒ่าเมื่อเปรียบเทียบในขนาด 250 มก/กก



รูปที่ 25 ผลของสารสกัดหมากเฒ่า และ มะปรางในชั้นเอทานอล ต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำในการทดสอบ Morris water maze. แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SEM (n = 8). * = p-value <0.05, เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีภาวะความจำบกพร่อง

2.6.3 ผลของสารสกัดหามากเมาและมะปรางต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาได้รับ Scopolamine โดยวิธี Modified Y-maze

ฤทธิ์ของสารสกัดหามากเมาและมะปรางในชั้นเอทานอล ในการฟื้นฟูภาวะความจำและการเรียนรู้ที่บกพร่องในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย scopolamine ถูกทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา Modified Y-maze ซึ่งเป็นโมเดล สำหรับวัดผล short-term memory จากผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับ scopolamine เพียงอย่างเดียวใช้เวลาในการสำรวจในแขนใหม่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมปกติ (% new arm entry ของกลุ่มควบคุมปกติ (sham) และกลุ่มที่ได้รับ scopolamine คือ 44.2 % และ 32.5 % ตามลำดับ) เมื่อให้สารสกัดหามากเมา หรือสารสกัดมะปรางในขนาด 250 มก/กก/วัน แก่หนูติดต่อกัน 7 วัน ก่อนเหนี่ยวนำให้หนูมีภาวะการเรียนรู้และความจำบกพร่องโดย scopolamine พบว่าทั้งสารสกัดหามากเมาและสารสกัดมะปรางสามารถเพิ่ม % of new arm entry ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่เกิดภาวะความจำเสื่อม โดยให้ค่า % of new arm entry เท่ากับ 38.8 และ 43.4 ตามลำดับ ดังรูปที่ 26 จากผลการทดลองแสดงว่าสารสกัดจากผลหามากเมาและสารสกัดจากผลมะปรางสามารถป้องกันภาวะความจำชนิด short-term memory เสื่อมเนื่องจาก scopolamine ได้



รูปที่ 26 ผลของสารสกัดหามากเมา และ มะปรางในชั้นเอทานอล ต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำในการทดสอบด้วย Modified Y-Maze. แสดงข้อมูลด้วยค่า mean + SEM (n = 10). * และ ** = p-value < 0.05 และ <0.01 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีภาวะความจำบกพร่อง ## = p-value < 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ

จากการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อคัดกรองฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชั่น และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัด 4 ชนิด คือ น้ำคั้นจากผลหามากเมา สารสกัดจากผลหามากเมาในเอทานอล น้ำคั้นจากผลมะปราง และสารสกัดจากผลมะปรางใน เอทานอล พบว่า สารสกัดของผลมะปรางในชั้นเอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น แรงที่สุดด้วยค่า $IC_{50} = 73.28 \mu\text{g/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำคั้น และสารสกัดในเอทานอล พบว่าทั้งสารสกัดมะปรางและหามากเมาในชั้นเอทานอล

มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าน้ำคั้น สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดไม่มีฤทธิ์หรือมีฤทธิ์น้อยในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส และจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) ถึงฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และจาก beta amyloid ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ดีในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาททั้งจากภาวะ oxidative stress และจาก beta amyloid

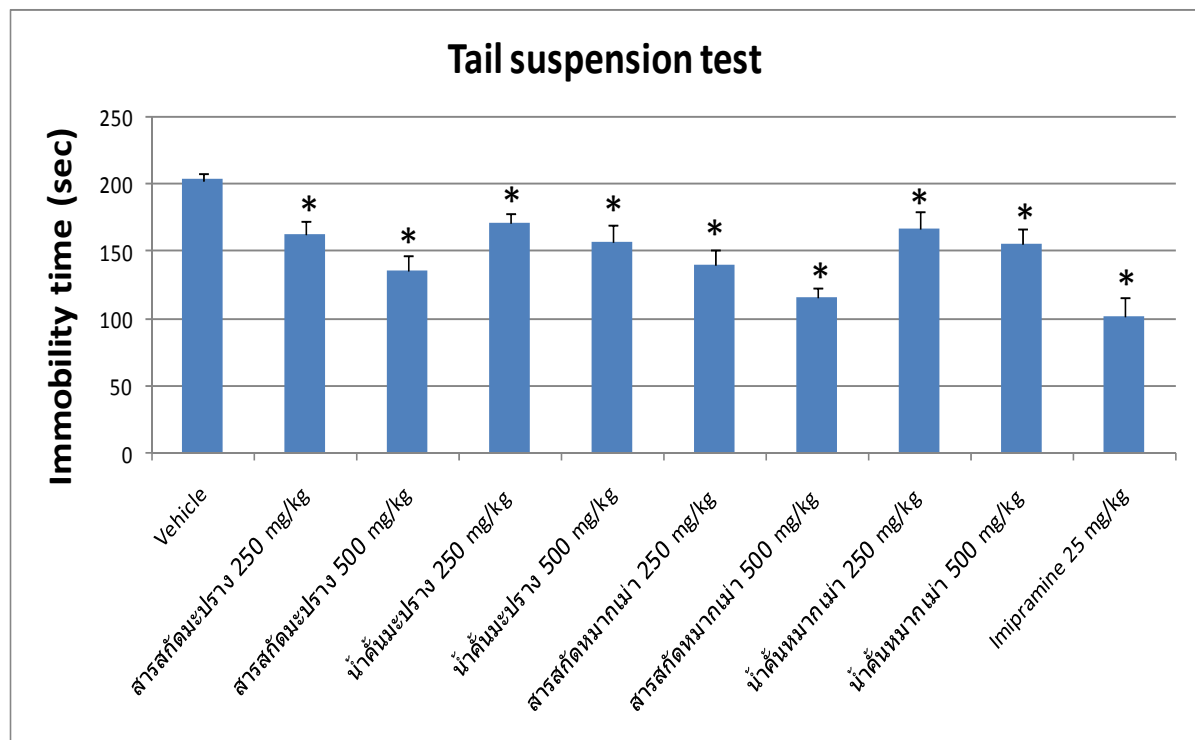
จากการทดสอบฤทธิ์ในการเพิ่มความจำของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าในชั้นเอทานอล ด้วยวิธี Water maze test พบว่าทั้งสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองได้ เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ในแบบจำลองสัตว์ทดลอง Morris water maze test และ Modified Y-maze test พบว่าสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าสามารถลดเวลาในการหาแผ่นรอง (Escape latency time) ในการทดสอบ Morris water maze ของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Scopolamine นอกจากนี้สารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่ายังสามารถเพิ่ม % of a new arm entry ในการทดสอบ Modified Y-maze test ของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Scopolamine เพียงอย่างเดียว ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่าทั้งสารสกัดจากผลมะพร้าวและผลหมากเฒ่ามีผลเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ และสามารถป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ได้ โดยมีผลทั้ง spatial short-term memory (ความจำระยะสั้น) และ spatial long term memory (ความจำระยะยาว)

3. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าในการต้านภาวะซึมเศร้าในหนูเมาส์

3.1 ผลการศึกษาคัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของมะพร้าวและหมากเฒ่าในหนูเมาส์ปกติ

3.1.1 ผลของมะพร้าวและหมากเฒ่าต่อค่า Immobility time ในแบบทดสอบ Tail suspension test ในหนูเมาส์ปกติ

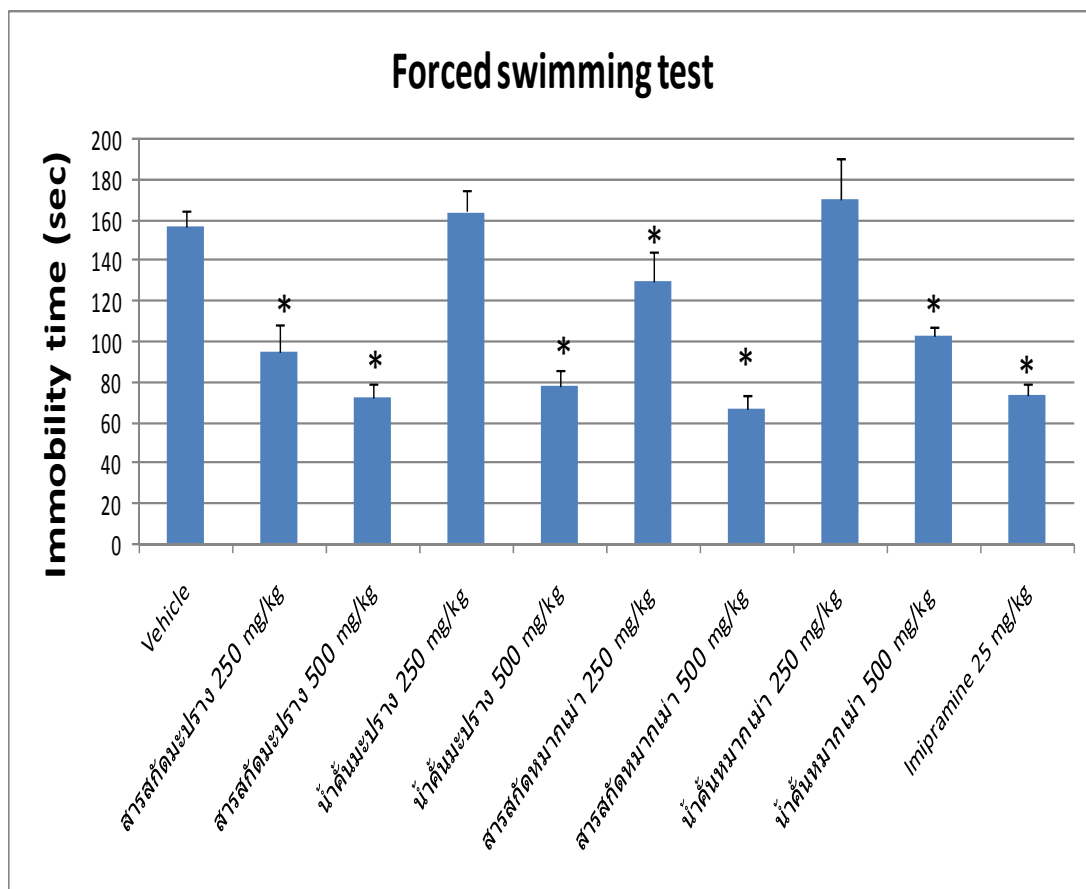
สารสกัดมะพร้าวในชั้นเอทานอล น้ำคั้นมะพร้าว สารสกัดหมากเฒ่าและน้ำคั้นหมากเฒ่าสามารถลด immobility time ในหนูเมาส์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเมาส์กลุ่มควบคุมที่ได้รับ vehicle และการลดลงของค่า immobility time ขึ้นกับขนาดยาที่ได้รับ โดยขนาดยาที่สูง 500 มก/กก จะลดค่า immobility time ได้ดีกว่าขนาดยา 250 มก/กก และสารสกัดหมากเฒ่าในชั้นเอทานอลสามารถลด immobility time ในหนูเมาส์ได้ดีที่สุด ด้วยค่า immobility time = 116.04 ± 6.69 วินาที และให้ผลดีเทียบเท่ากับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน Imipramine ซึ่งให้ค่า immobility time = 101.02 ± 14.21 วินาที



รูปที่ 27 ผลของมะพร้าวและหมากเฒ่าต่อค่า Immobility time ของหนูเมาส์ในแบบทดสอบ Tail suspension test (mean±S.E.M, n=8-10) *p value < 0.05 vs vehicle control group

3.2.1 ผลของมะพร้าวและหมากเฒ่าต่อค่า Immobility time ของหนูเมาส์ปกติ ในแบบทดสอบ Forced swimming test

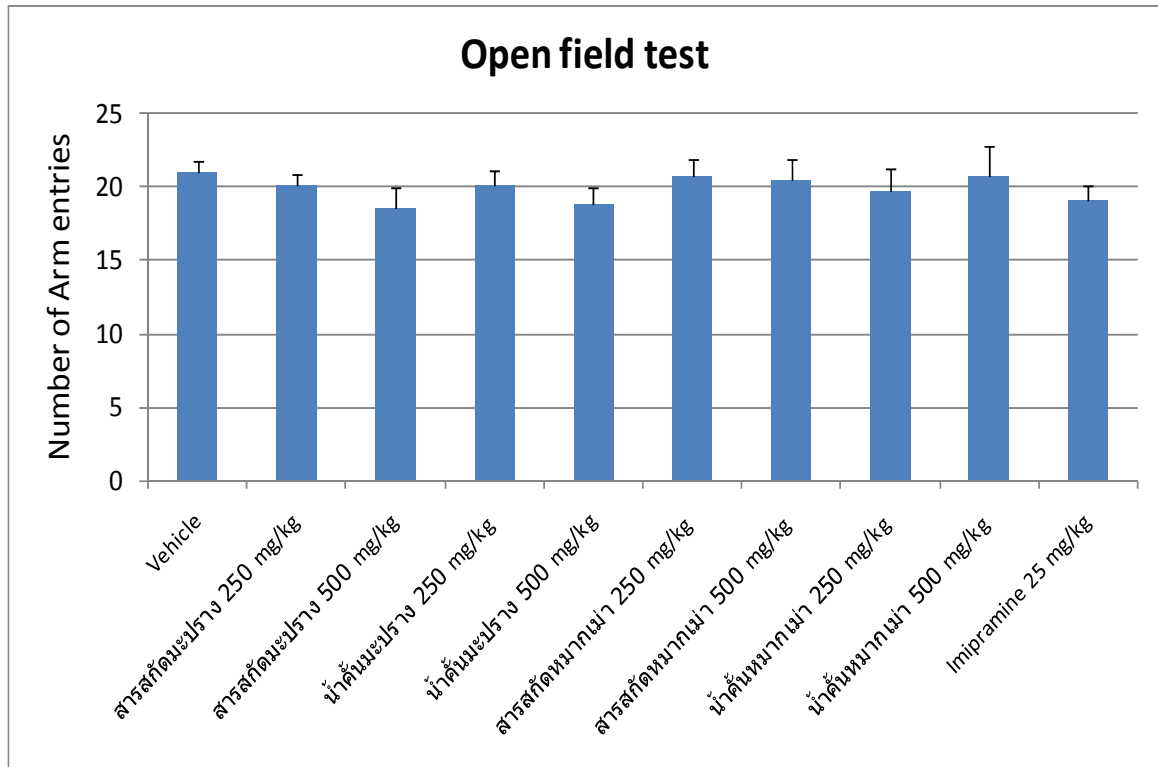
สารสกัดมะพร้าวในชั้นเอทานอล ขนาด 250 และ 500 มก/กก, น้ำคั้นมะพร้าว ขนาด 500 มก/กก สารสกัดหมากเฒ่าขนาด 250 และ 500 มก/กก และน้ำคั้นหมากเฒ่าขนาด 500 มก/กก สามารถลด immobility time ในหนูเมาส์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเมาส์กลุ่มควบคุมที่ได้รับ vehicle และการลดลงของค่า immobility time ขึ้นกับขนาดยาที่ได้รับ โดยขนาดยาที่สูง 500 มก/กก จะลดค่า immobility time ได้ดีกว่าขนาดยา 250 มก/กก และสารสกัดหมากเฒ่าในชั้นเอทานอลสามารถลด immobility time ในหนูเมาส์ได้ดีที่สุด ด้วยค่า immobility time = 66.98 ± 5.92 วินาที และให้ผลดีเทียบเท่ากับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน Imipramine ซึ่งให้ค่า immobility time = 73.44 ± 5.39 วินาที ส่วนน้ำคั้นมะพร้าวและหมากเฒ่าที่ขนาดยาดำ 250 มก/กก ไม่สามารถลดค่า immobility time ได้



รูปที่ 28 ผลของมะพร้าวและหนามแมวต่อค่า Immobility time ของหนูเมาส์ในแบบทดสอบ Forced swimming test (mean±S.E.M, n=8-10) *p value < 0.05 vs vehicle control group

3.3.1 ผลของมะพร้าวและหนามแมวต่อ locomotor activity ของหนูเมาส์ปกติ ในแบบทดสอบ Y maze test

จากการทดลองพบว่าทั้งสารสกัดและน้ำคั้นของมะพร้าวและหนามแมว ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมปกติ เช่นเดียวกับ imipramine ซึ่งเป็นยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน ดังรูปที่ 3



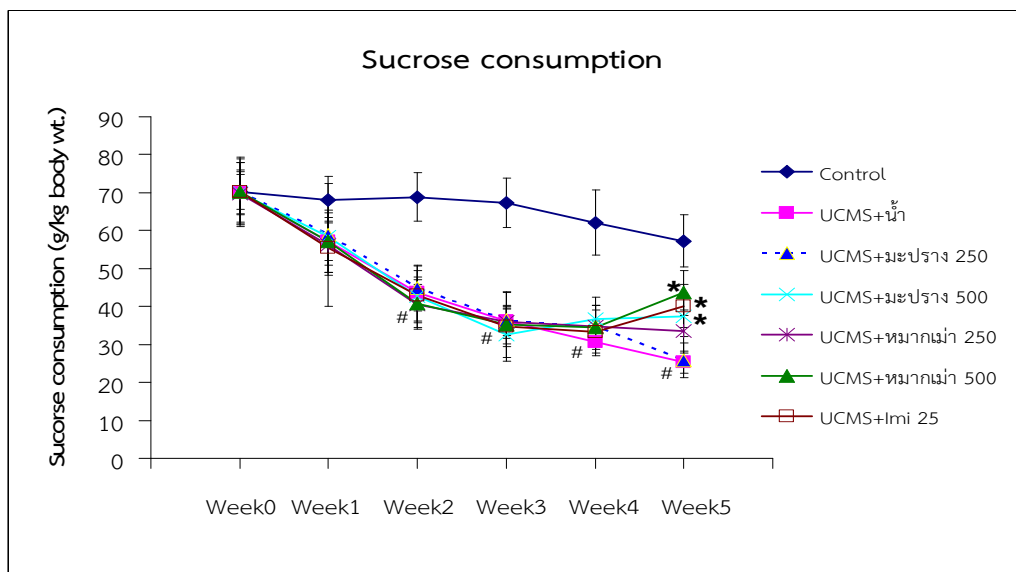
รูปที่ 29 ผลของมะพร้าวและหมากเฒ่าต่อ locomotor activity ของหนูเมาส์ในแบบทดสอบ Y maze test (mean±S.E.M, n=8-10)

3.2 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าต่อพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดสะสมเป็นระยะเวลานาน ในแบบจำลองภาวะซึมเศร้าแบบ Unpredictable Chronic mild stress (UCMS)

จากการคัดกรองฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้าของสารสกัด และน้ำคั้นที่ได้จากมะพร้าวและหมากเฒ่า โดยใช้แบบจำลอง tail suspension test และ forced swimming test นั้น พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ที่ดีกว่าน้ำคั้น จึงเลือกเฉพาะส่วนที่เป็นสารสกัดมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยใช้แบบจำลองที่หนูถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดสะสมเป็นระยะเวลานาน (Unpredictable chronic mild stress) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดในระยะยาวด้วย

3.2.1 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าต่อการบริโภคน้ำตาลซูโครส

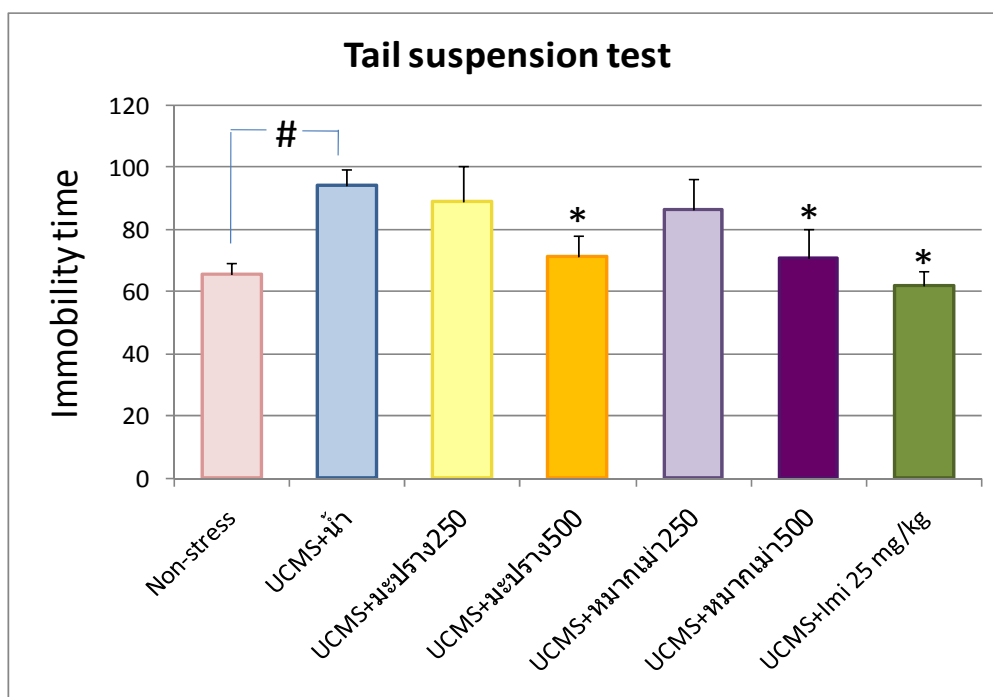
จากกราฟในรูปที่ 30 พบว่าปริมาณการบริโภคซูโครสจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับภาวะความเครียด โดยการบริโภคน้ำตาลจะลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 หลังการได้รับความเครียด และลดลงเรื่อยๆในสัปดาห์ที่ 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 หนูกลุ่มควบคุมบริโภคน้ำตาลได้น้อยลงอาจจะเป็นผลมาจากการที่หนูได้รับความเครียดจากการที่ถูกฉีดยาทุกวันในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 จึงอาจจะเกิดภาวะเครียดได้เล็กน้อย และหนูที่ได้รับภาวะเครียดรวมกับการได้รับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 25 มก/กก และ สารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าในขนาด 500 มก/กก สามารถที่จะบริโภคน้ำตาลได้เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับภาวะเครียดร่วมกับ น้ำกระสายยา หลังได้รับยาในสัปดาห์ที่ 5



รูปที่ 30 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าต่อการบริโภคน้ำตาลซูโครสในหนูเม้าส์ที่หนูเหี่ยวน่าให้เกิดภาวะซึมเศร้าภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน (mean±S.E.M, n=10-12) #p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด *p value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดและน้ำกระสายยา

3.2.2 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าต่อค่า immobility time ในแบบทดสอบ tail suspension test ในหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

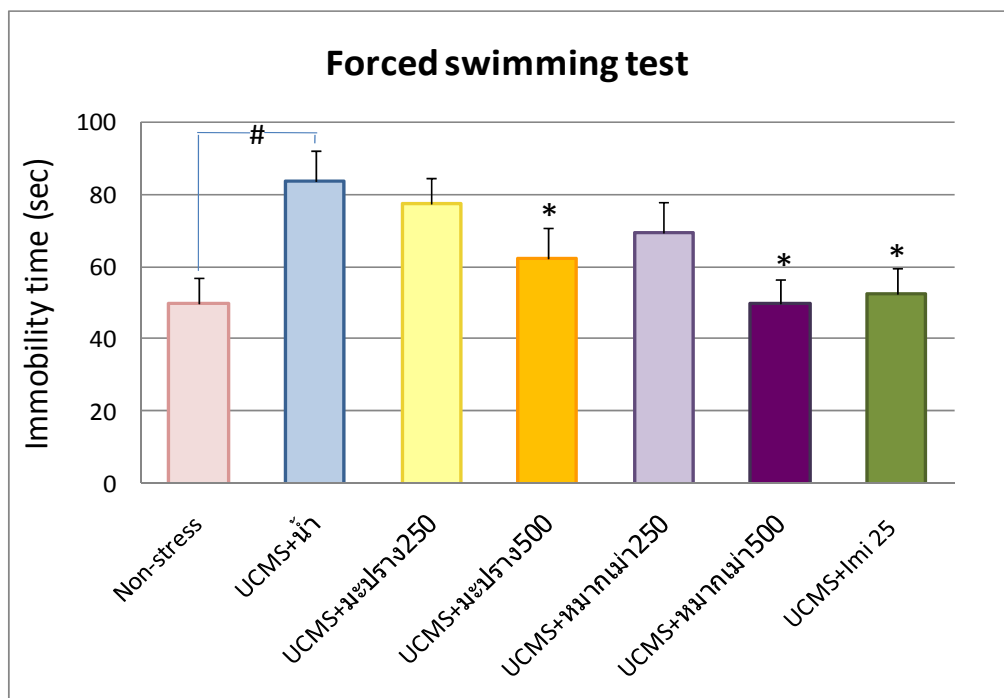
จากการทดลองพบว่าหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน จะมีค่า immobility time สูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการให้สารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าในขนาด 500 มก/กก ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สามารถที่จะลดค่า immobility time ในหนูที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนลงได้ และลดลงแบบ dose dependent ด้วย และสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าในขนาด 500 มก/กก สามารถที่จะลดค่า immobility time ได้ไม่แตกต่างกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine ที่ขนาด 25 มก/กก, i.p. ดังรูปที่ 31



รูปที่ 31 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเมาต่อค่า immobility time ในแบบทดสอบ tail suspension test ในหนูเมาส์ที่หนูหนึ่งย่นำให้เกิดภาวะซึมเศร้าภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน
Data expressed as mean $\pm$ S.E.M.,n=8-12. #P<0.05 compared with non-stress control group; *P<0.05 compared with UCMS group.

3.2.3 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเมาต่อค่า immobility time ในแบบทดสอบ forced swimming test ในหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

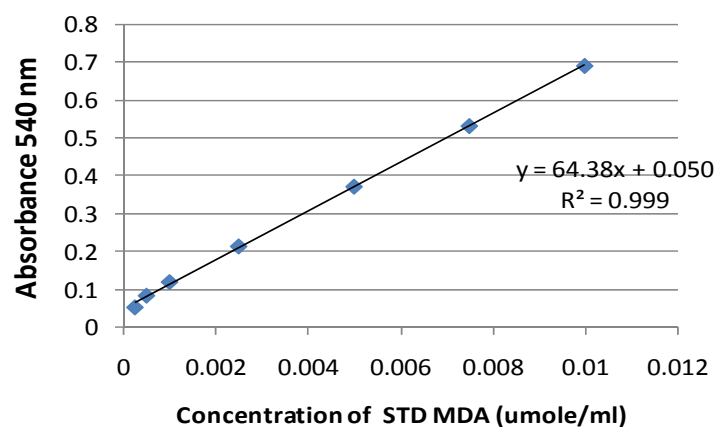
จากการทดลองพบว่าหนูที่ถูกเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน จะมีค่า immobility time สูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อหนูที่ได้รับความเครียดรวมกับการได้รับสารสกัดมะพร้าวและหมากเมาในขนาด 250 มก/กก ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง immobility time เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม UCMS เฉพาะขนาดยาที่สูงขึ้นเป็น 500 มก/กก จึงจะลดค่า immobility time ที่เพิ่มขึ้นจากการได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน ส่วน และสารสกัดมะพร้าวและหมากเมาในขนาด 500 มก/กก สามารถที่จะลดค่า immobility time ได้ไม่แตกต่างกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine (25 มก/กก, i.p.) ดังรูปที่ 32



รูปที่ 32 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าต่อค่า immobility time ในแบบทดสอบ forced swimming test ในหนูเม้าส์ที่หนูเหนียวทำให้เกิดภาวะซึมเศร้าภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน
Data expressed as mean $\pm$ S.E.M.,n=8-12. #P<0.05 compared with non-stress control group; *P<0.05 compared with UCMS group.

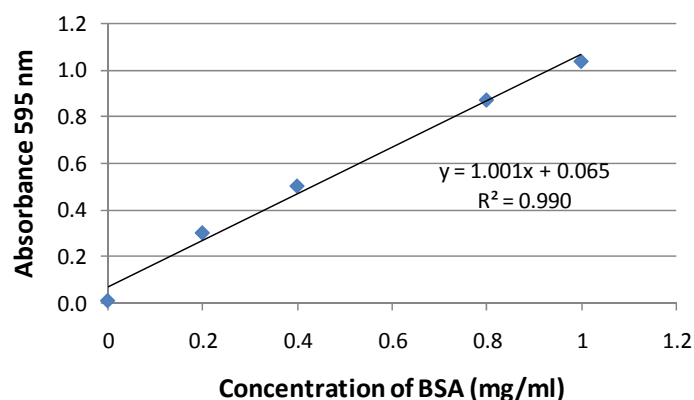
3.3 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าต่อการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation โดยวิธี thiobarbituric acid assay ในหนูเม้าส์ที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

3.3.1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย malondialdehyde ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี TBAR method



รูปที่ 33 กราฟมาตรฐานของสารละลาย malondialdehyde

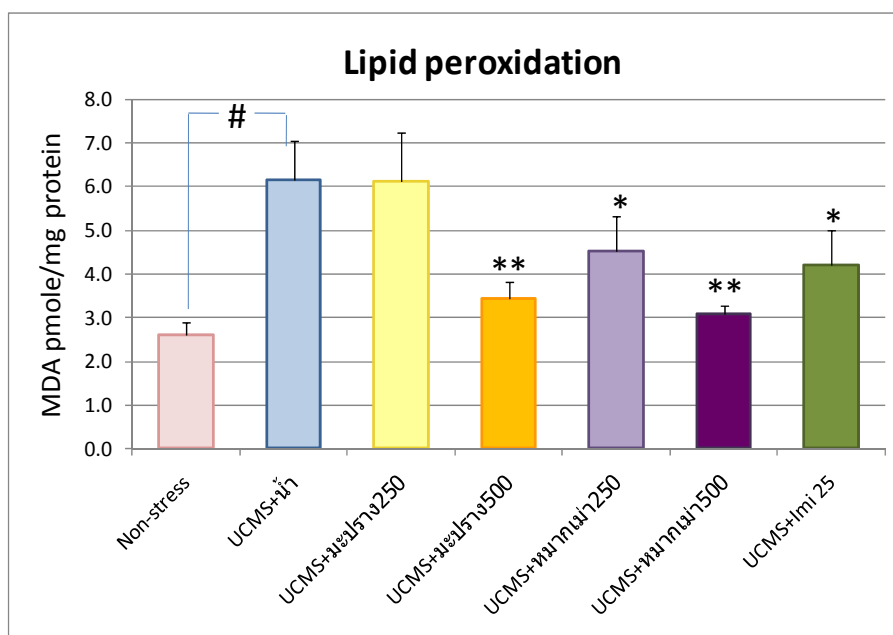
3.3.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm



รูปที่ 34 กราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin

3.3.3 ผลของ UCMS ในการเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation และ ผลของสารสกัดมะพร้าว และหมากเฒ่าในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในสมองหนูเมาส์ที่ได้รับ UCMS

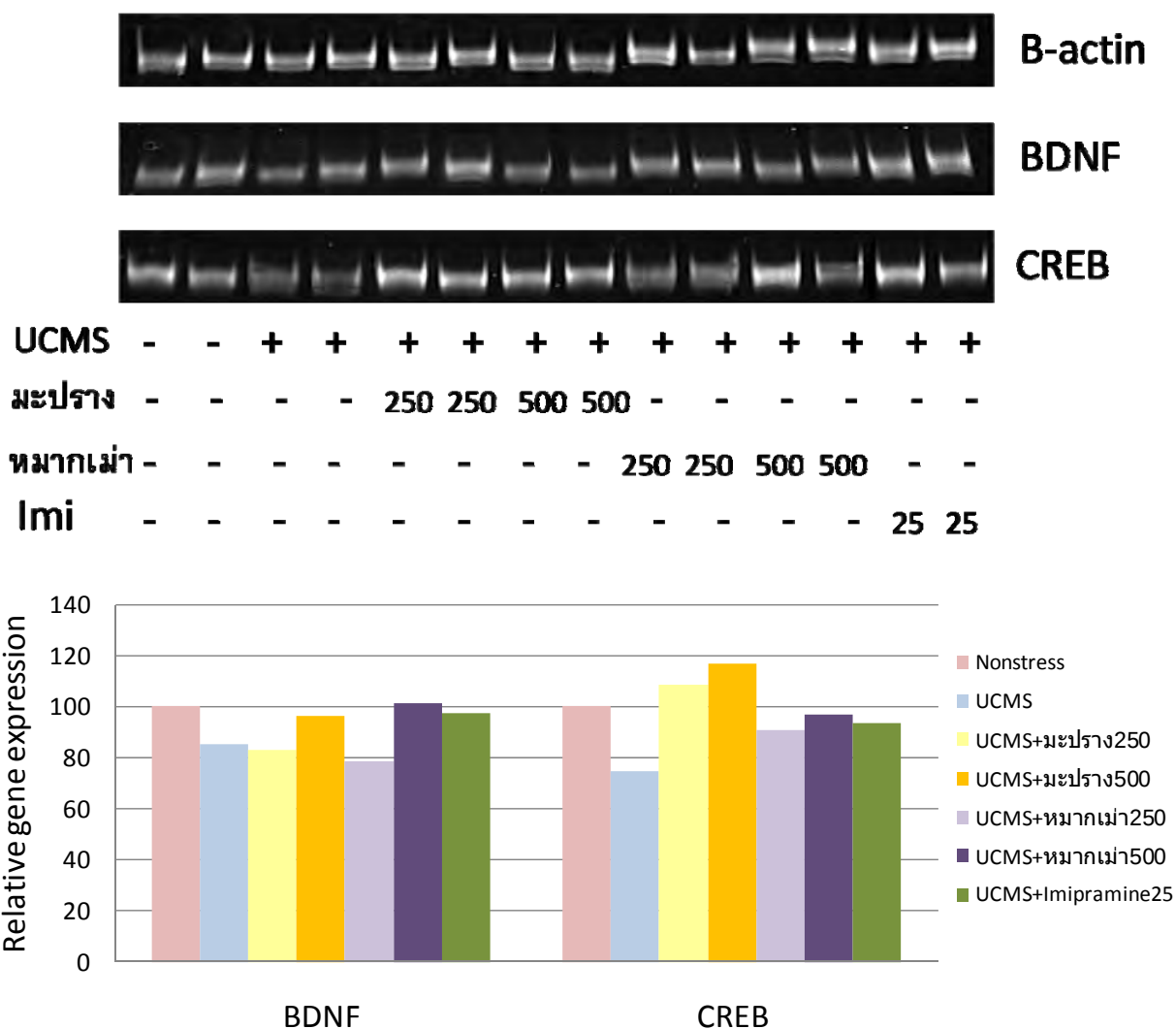
การให้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน 5 สัปดาห์ สามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation ในสมองมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด และการได้รับสารสกัดมะพร้าว (500 มก/กก) และ สารสกัดหมากเฒ่า (250 มก/กก และ 500 มก/กก) ติดต่อกัน 2 สัปดาห์ สามารถที่จะยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในสมอง ได้อย่างมีนัยสำคัญ และยับยั้งแบบ concentration dependent manner ส่วนการได้รับ imipramine มีผลลดการเกิด lipid peroxidation ของสมองได้เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 35



รูปที่ 35 ผลของสารสกัดมะพร้าวและพริกต่อการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในหนูเม้าส์ที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน Data expressed as mean $\pm$ S.D,n=3-5. #P<0.05 compared with non-stress control group; *P<0.05, **P<0.01 compared with UCMS group.

3.4 ผลของสารสกัดมะพร้าวและพริกต่อการแสดงออกของยีน BDNF, และ CREB ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า โดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

จากการทดลองพบว่า การให้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานจะมีผลลดการแสดงออกของ BDNF และ CREB mRNA ในสมองส่วน hippocampus อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อหนูได้รับสารสกัดมะพร้าว หรือพริก ร่วมกับการได้รับความเครียดอย่างอ่อน พบว่าทั้งสารสกัดมะพร้าว และพริก ที่ขนาด 500 มก/กก/วัน สามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน BDNF และ CREB mRNA ได้ในสมองส่วน hippocampus โดยให้ผลเช่นเดียวกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine ที่ขนาดยา 25 มก/กก/วัน



รูปที่ 36 ผลของสารสกัดมะพร้าวและหมากเฒ่าต่อการแสดงออกของยีน BDNF และ CREB ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกทางด้านภาวะซึมเศร้า ในสมองส่วน hippocampus เปรียบเทียบระหว่างหนูกลุ่มควบคุมและหนูกลุ่มที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน และหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัด (mean±S.E.M, n=3-4), (#P<0.05 vs control group and *P<0.05 vs UCMS group)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี

4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ ทองแดง, เหล็ก, สังกะสี, ลิเทียม, ตะกั่ว, แคลเซียม, แมกนีเซียม, ซีลีเนียม โดยวิธี Atomic Absorption Spectroscopy

จากการทดลองเมื่อคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นมาจากสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าปริมาณ ทองแดง, เหล็ก, สังกะสี, ลิเทียม, ตะกั่ว, แคลเซียม, แมกนีเซียม, ซีลีเนียม ในสารสกัดทั้ง 2 ส่วนจากผลมะพร้าวและหมากเฒ่า ดังแสดงในตารางที่ 8

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ ซีลีเนียม โดยวิธี UV Spectrophotometry

จากการทดลองเมื่อคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นมาจากสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ ซีลีเนียม พบว่าปริมาณ ซีลีเนียม ในสารสกัดทั้ง 2 ส่วนจากผลมะปรางและหมากเฒ่า ดังแสดงในตารางที่ 8

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ Boron โดย Boron test kit

จากผลการทดสอบหาปริมาณ Boron โดยใช้ชุดทดสอบ boron test kit (Hanna®) พบว่าไม่สามารถตรวจพบ boron ในส่วนสกัดทั้งสองส่วนจากผลมะปรางโดยวิธีนี้ได้ ในขณะที่มีการตรวจพบได้ในส่วนสกัดทั้งสองส่วนในผลสุกของหมากเฒ่า ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณแร่ธาตุแต่ละชนิดที่ตรวจพบในสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฒ่า

Trace elements	ปริมาณที่พบในสารสกัด (ไมโครกรัม/กรัม, n=5)			
	สารสกัดผลมะปราง		สารสกัดผลหมากเฒ่า	
	น้ำคั้น	95%เอทานอล	น้ำคั้น	95%เอทานอล
ทองแดง	4.38±0.10	1.57±0.03	2.39±0.14	2.31±0.06
เหล็ก	7.48±0.59	7.19±0.22	18.96±0.54	16.42±0.76
สังกะสี	3.24±0.06	1.14±0.05	30.28±0.20	20.66±0.22
ลิเทียม	0.35±0.02	0.22±0.02	0.45±0.01	0.34±0.05
ตะกั่ว	nd	1.57±0.67	0.15±0.02	7.21±0.47
แคลเซียม	3.87±0.04	113.7±0.21	1.44±0.01**	1.37±0.01**
แมกนีเซียม	0.33±0.00**	0.01±0.00**	1.68±0.01**	3.21±0.01**
ซีลีเนียม*	nd*	nd*	nd*	nd*
Boron	nd	nd	nd	nd

* เนื่องจากสีของสารละลายอาจมีผลต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ใช้โดยวิธี UV spectrophotometer ดังนั้นจึงได้ใช้วิธี AAS เพื่อเปรียบเทียบผลที่ได้

** รายงานผลการวิเคราะห์ในหน่วยของ มิลลิกรัม/กรัม ของสารสกัด

nd = not detect

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (Total carotenoids) โดยวิธี UV-Spectrophotometry

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมโดยเทียบกับสารมาตรฐาน β -carotene และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นมาจากสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ β -carotene พบปริมาณแคโรทีนอยด์รวมดังแสดงในตารางที่ 6

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ β -carotene โดยวิธี High performance liquid chromatography

จากการทดลอง เมื่อเตรียมตัวอย่างแล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC คำนวณหาปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ ของ β -carotene พบปริมาณ β -carotene ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและ β -carotene ในสารสกัดผลมะปรางและหมากเฒ่าจากส่วนของน้ำคั้นและ 95%เอทานอล

สารที่วิเคราะห์	ปริมาณที่พบในสารสกัด (มิลลิกรัม/กรัม, n=5)			
	สารสกัดผลมะปราง		สารสกัดผลหมากเฒ่า	
	น้ำคั้น	95%เอทานอล	น้ำคั้น	95%เอทานอล
Total carotenoid	0.13 $\pm$ 0.002	13.29 $\pm$ 0.002	0.06 $\pm$ 0.14	0.64 $\pm$ 0.06
β -carotene	0.12 $\pm$ 0.02	13.12 $\pm$ 0.09	nd	nd

nd = not detect

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อคัดกรองฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัด 4 ชนิด คือ น้ำคั้นจากผลหมากเฒ่า สารสกัดจากผลหมากเฒ่าใน เอทานอล น้ำคั้นจากผลมะปราง และสารสกัดจากผลมะปรางใน เอทานอล พบว่า สารสกัดของผลมะปรางในชั้น เอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แรงที่สุดด้วยค่า IC₅₀ = 73.28 μ g/ml เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำคั้น และสารสกัดใน เอทานอล พบว่าทั้งสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในชั้น เอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าน้ำคั้น สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดไม่มีฤทธิ์หรือมีฤทธิ์น้อยในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส และจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) ถึงฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และจาก beta amyloid ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ดีในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาททั้งจากภาวะ oxidative stress และจาก beta amyloid

จากการทดสอบฤทธิ์ในการเพิ่มความจำของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในชั้น เอทานอล ด้วยวิธี Water maze test พบว่าทั้งสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองได้ เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ในแบบจำลองสัตว์ทดลอง Morris water maze test และ Modified Y-maze test พบว่าสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าสามารถลดเวลาในการหาแผ่นรอง (Escape latency time) ในการทดสอบ Morris water maze ของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Scopolamine นอกจากนี้สารสกัดมะปรางและหมากเฒ่ายังสามารถเพิ่ม % of a new arm entry ในการทดสอบ Modified Y-maze test ของสัตว์ทดลองได้

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Scopolamine เพียงอย่างเดียว ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่าทั้งสารสกัดจากผลมะปรางและผลหมากเฒ่ามีผลเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ และสามารถป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ได้ โดยมีผลทั้ง spatial short-term memory (ความจำระยะสั้น) และ spatial long term memory (ความจำระยะยาว)

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาผลของมะปรางและหมากเฒ่าในการต้านภาวะซึมเศร้าในหนูทดลอง โดยแรกเริ่มได้คัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของมะปรางและหมากเฒ่าในหนูปกติ ด้วยวิธีทดสอบ tail suspension test (TST) และ forced swimming test (FST) พบว่ามะปรางและหมากเฒ่า สามารถที่จะลดค่า immobility time ในหนูลงได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยา โดยในส่วนที่เป็นน้ำคั้นจะลด Immobility time ได้ดีไม่เท่าส่วนที่เป็นสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล ที่สามารถลดค่า immobility time ได้ทั้งในขนาดยา 250 มก/กก และ 500 มก/กก โดยผลในการเปลี่ยนแปลงภาวะซึมเศร้านี้ไม่มีผลต่อการต่อการเปลี่ยนแปลง locomotor activity เมื่อทดสอบด้วยวิธี Y maze test นั้นก็แสดงว่าค่า immobility time ที่ลดลงนั้นในหนูที่ได้รับมะปรางและหมากเฒ่า นั้น เป็นผลมาจากการที่มะปรางและหมากเฒ่าออกฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้า โดยให้ผลเช่นเดียวกับ ยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 25 มก/กก ซึ่งสามารถที่จะลด immobility time โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity ดังนั้นจึงได้ทดสอบฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของสารสกัดเอทานอลของมะปรางและหมากเฒ่าในแบบจำลอง unpredictable chronic mild stress (UCMS) ต่อไปเพื่อดูถึงผลของการให้ยาในระยะยาว และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าผ่านการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้าและยังศึกษาถึงผลของการเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนต่อการเกิด lipid peroxidation ในสมองด้วย

หนูทดลองถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน 5 สัปดาห์เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้า จากนั้นวัด anhedonia behavior ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่บ่งบอกถึงภาวะซึมเศร้าอันหนึ่ง โดยวิธี sucrose consumption จากการทดลองพบว่าในสัปดาห์ที่ 0 เริ่มทดลองหนูทุกกลุ่มจะมีปริมาณการบริโภคซูโครสเท่าๆกันคือประมาณ 70 g/kg body weight หนูที่ได้รับการเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานจะมีการบริโภคซูโครสลดลงอย่างมีนัยสำคัญในทุกๆสัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียดเลย และเมื่อได้รับสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าขนาด 250 มก/กก และ 500 มก/กก ติดต่อกันทุกวันในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 พบว่าการบริโภคน้ำตาลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และให้ผลเช่นเดียวกับ ยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 25 มก/กก และการทดสอบด้วยวิธี FST และ TST ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบพฤติกรรมซึมเศร้า ก็พบว่าสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าขนาด 250 มก/กก และ 500 มก/กก สามารถที่จะลด immobility time ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับความเครียดพร้อมกับน้ำกระสายยา ดังนั้นจากการทดสอบทางด้านพฤติกรรม จึงได้ข้อสรุปว่า สารสกัดมะปรางและหมากเฒ่ามีผลต้านภาวะซึมเศร้าได้ในหนูที่ถูกเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน โดยกลไกการออกฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของมะปรางและหมากเฒ่าในส่วนหนึ่งน่าจะมาจากการที่มะปรางและหมากเฒ่า มีผลเพิ่มการแสดงออกของ BDNF และ CREB mRNA จากการทดสอบด้วยวิธี reverse transcription และ polymerase chain reaction เนื่องจากผลการศึกษาพบว่า หนูที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานมีผลทำให้การแสดงออกของยีนสองตัวนี้ลดลงอย่างมากโดยเฉพาะในสมองส่วน hippocampus ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ควบคุมเกี่ยวกับการเรียนรู้และการแสดงออกทางด้านอารมณ์และพฤติกรรม BDNF เป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการบวกรวม neurogenesis การสร้างการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ประสาทและ synapses BDNF จะพบมากในสมองส่วน hippocampus และ basal forebrain ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความจำ การเรียนรู้ และการแสดงออกทางด้าน

พฤติกรรมและอารมณ์ (Malberg JE et al., 2005) จากหลายรายงานการศึกษา (Xu et al. 2006, 2007) พบว่า การได้รับความเครียดเป็นระยะเวลานาน และในคนไข้ที่เป็น chronic depression จะมีการแสดงออกของยีนตัวนี้ลดลงอย่างมาก ร่วมกับการที่มีสมองส่วน hippocampus ที่ฝ่อเล็กลงมากกว่าปกติ และเมื่อได้รับการรักษาด้วยยาต้านซึมเศร้าอย่างต่อเนื่อง ก็สามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีนตัวนี้ให้กลับสู่ภาวะปกติได้ และยีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการ transcription ของยีน BDNF นี้คือ CREB CREB เป็น cellular transcription factor ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการ transcription ของยีนหลายๆตัวเช่น BDNF, neuropeptide, tyrosine hydroxylase เป็นต้น CREB protein ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของสมองหลายอย่างที่สำคัญคือกระบวนการสร้าง long term memories และ survival ของเซลล์ประสาท ดังนั้นทั้ง CREB และ BDNF จึงทำงานร่วมกันในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์สมอง การเรียนรู้และการสร้างความจำ การศึกษาครั้งนี้พบว่าในหนูที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานจะมีการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF ในสมองส่วน hippocampus ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด และเมื่อได้รับสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในขนาด 250 และ 500 มก/กก/วัน สามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีนตัวนี้กลับคืนมาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการให้ยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 25 มก/กก/วัน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับความเครียดเป็นระยะเวลานานที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยา ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของมะปรางและหมากเฒ่าในการต้านภาวะซึมเศร้า ส่วนหนึ่งน่าจะมาจากการที่มะปรางและหมากเฒ่าสามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของมะปรางและหมากเฒ่าผ่านกลไกด้านอื่นๆยังจำเป็นที่จะต้องทำต่อไปเพื่อ ยืนยันการออกฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของสารสกัด

นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้ ยังได้ศึกษาผลของการได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานต่อการเกิด lipid peroxidation ในสมองด้วย โดยศึกษาใน whole brain ด้วยวิธี Thiobarbituric acid method และใช้ malondialdehyde เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบการเกิด lipid peroxidation ผลการศึกษาพบว่า การได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน มีผลเพิ่มการเกิด lipid peroxidation ในสมอง ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับสมมุติฐานที่ว่าความเครียดสามารถที่จะเหนี่ยวนำการเกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากในสมอง ทำให้เซลล์สมองถูกทำลาย ดังนั้นเมื่อได้รับสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่า ซึ่งมีฤทธิ์ทั้งในการต้านภาวะซึมเศร้า และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วย จึงสามารถที่จะยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในสมองได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียด ส่วนหนูที่ได้รับสารต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine 25 มก/กก ก็มีผลในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ด้วยเช่นกัน แต่ความสามารถในการยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชันอาจจะไม่ดีเท่ากับสารสกัดทั้งสอง เนื่องจาก imipramine ยับยั้งด้วยกลไกการลดเครียด ลดภาวะซึมเศร้าเท่านั้น แต่ไม่มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า มะปรางและหมากเฒ่ามีฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้าได้ทั้งในหนูปกติ และหนูที่ได้รับการเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน ในแบบจำลอง UCMS โดยกลไกการออกฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการที่สารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าสามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ neurogenesis และ survival ของ neuron ในสมอง โดยเฉพาะส่วน hippocampus ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้ การแสดงออกทางด้านพฤติกรรมและอารมณ์ โดยผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่า นั้น ให้ผลเช่นเดียวกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine ทั้งในด้านการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า และการยับยั้งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในสมอง

จากผลการศึกษาการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่าในสารสกัดจากผลสุกของมะปราง มีแร่ธาตุที่ถูกตรวจพบโดยวิธีการศึกษาในครั้งนี้คือ ทองแดง เหล็ก สังกะสี ลิเทียม ตะกั่ว แคลเซียม และแมกนีเซียม โดยพบในปริมาณที่แตกต่างกันในส่วนของน้ำคั้นและส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล โดยเฉพาะทองแดง และ สังกะสี จะพบปริมาณในน้ำคั้นมากกว่าจากส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล ในขณะที่ปริมาณแร่ธาตุชนิดอื่นพบในปริมาณที่ใกล้เคียงกันในส่วนสกัดทั้งสอง แต่จากการศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและ β -carotene ในสารสกัดผลมะปราง พบว่าในส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล จะพบในปริมาณที่สูงกว่าในส่วนคั้นน้ำมากถึง 13 เท่า ส่วนการศึกษาในสารสกัดจากผลสุกของหมากเฒ่า มีการวิเคราะห์พบแร่ธาตุดังนี้คือ ทองแดง, เหล็ก, สังกะสี, ลิเทียม, ตะกั่ว, แคลเซียม, แมกนีเซียม โดยพบ แคลเซียม, แมกนีเซียม, เหล็ก และ สังกะสี ในปริมาณที่สูงทั้งในส่วนคั้นน้ำและส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล โดยปริมาณพบสูงกว่าผลสุกของมะปรางถึง 2-3 เท่า สำหรับ เหล็ก และ ประมาณ 10 เท่าสำหรับ สังกะสี แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและ β -carotene ในสารสกัดผลหมากเฒ่า พบว่ามีปริมาณต่ำมากเมื่อเทียบกับมะปราง จากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ได้ข้อมูลในเชิงปริมาณของแร่ธาตุในส่วนสกัดทั้งสองจากผลสุกของมะปรางและหมากเฒ่า โดยจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางโภชนาการเป็นการส่งเสริมการบริโภคผลไม้ไทยทั้งสองชนิด โดยได้ประโยชน์และมีคุณค่าในการบริโภคผลสุกโดยตรงไม่จำเป็นต้องผ่านกรรมวิธีในการดัดแปลง โดยพิจารณาจากผลการศึกษาในส่วนคั้นน้ำที่พบปริมาณแร่ธาตุบางชนิดในปริมาณที่สูง แต่จากการศึกษาก็น่าสนใจอีกประการก็คือ มีการตรวจพบปริมาณของตะกั่วในส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล ของผลไม้ทั้งสองชนิด ซึ่งน่าจะเป็นสิ่งที่จะต้องพึงระวังในการบริโภค โดยอาจมาจากขั้นตอนของการเพาะปลูกและแหล่งของดินที่ใช้ในการเพาะปลูกก็เป็นไปได้

โดยสรุปแล้ว จากผลการศึกษาทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฒ่าสุกมีฤทธิ์ในการฟื้นฟูความจำ การเรียนรู้ และ ด้านภาวะซึมเศร้าในสัตว์ทดลองและยังพบปริมาณแร่ธาตุบางชนิดที่เป็นประโยชน์ในการบริโภค น่าจะเป็นผลไม้ที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นทางเลือกใหม่เพื่อใช้ในการฟื้นฟูภาวะของโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทเช่น โรคอัลไซเมอร์และโรคซึมเศร้าต่อไป ซึ่งนำไปสู่การแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการบริโภคและฟื้นฟูภาวะดังกล่าวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กัมมัล กุมารปาวา, สมบูรณ์ เกียรตินันท์, โสภิตา ธรรมตรี, สุธา ลุยศิริโรจนกุล, อังคณา ฉายประเสริฐ และ กรกนก อังคนันท์. การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย ของสมุนไพรมะเฒ่า และพืชสมุนไพรไทย 4 ชนิด: การศึกษาสมุนไพรไทยในการรักษาโรคเอดส์เพื่อพัฒนาเป็นยาอุตสาหกรรม. รายงานวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติสภาวิจัยแห่งชาติ. 2546. กรุงเทพฯ. 132 น
- รณชัย คงสกนธ์, วีระเดช วีระพงศ์เศรษฐ์ และ อัญชลี เตมียะประดิษฐ์. ปัจจัยเสี่ยงของโรคซึมเศร้า เอกสารในการประชุมวิชาการสุขภาพจิตนานาชาติ ครั้งที่ 4 เรื่องสุขภาพจิตกับภัยพิบัติ 6-8 กรกฎาคม 2548 ณ โรงแรมปรีณิพัลลภ กรุงเทพมหานคร หน้า 176.
- สมาน เดชสุภา และ สำรี มั่นเขตต์กรณ์. การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารโพลีฟีนอลในไวน์แดงสยามมัวร์ต่อการตายแบบอพอปโตซิสของเซลล์มะเร็งเต้านม ชนิด MDA-MD-435 ที่ปลูกถ่ายในหนูเป็ดที่ตัดต่อมไทมัส: ตรวจผลโดยการสร้างภาพระดับเคมีและฮิสโตเคมี. 2549. สืบค้นเมื่อ 10 มกราคม 2555 จาก <http://www.dtam.moph.go.th>.

- Bergström A, Jayatissa MN, Thykjaer T, Wiborg O. Molecular pathways associated with stress resilience and drug resistance in the chronic mild stress rat model of depression: a gene expression study. *J Mol Neurosci*. 2007; 33(2): 201-15.
- Bilia AR, Gallori S and Vincieri FF. St. John's wort and depression, Efficacy, safety and tolerability-an update. *Life Sci*. 2002; 70: 3077-96
- Bourdel-Marchasson I, Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, et al. Antioxidant defence and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing*. 2001; 30: 235-41.
- Butterweck V, Jurgenliemk G, Nahrstedt A and Winterhoff H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* 2000; 66(1): 3-6.
- Catena-Dell'osso M, Bellantuono C, Consoli G, Baroni S, Rotella F. and Marazziti D. Inflammatory and neurodegenerative pathways in depression: A new avenue for antidepressant development. *Curr Med Chem*. 2010; 29
- Chun W, Johnson GV. The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death. *Front Biosci*. 2007; 12: 733–56.
- Di Giacomo CD, Sorrenti V, Salerno L, Cardile et al. Novel inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *Exp Biol Med*. 2003, 228, 486 – 490.
- Duman R.S., Heninger G.R., Nestler E.J. A molecular and cellular theory of depression *Arch. Gen. Psychiatry*. 1997; 54, pp. 597–606
- Duman R.S., Monteggia L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders *Biol. Psychiatry*. 2006; 59 pp. 1116–112
- Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*. 2002; 23: 795-807.
- Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res*. 2004; 50: 433-440.
- Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA. Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol*. 1991; 1 (4): 279–86.
- Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1991; 12 (10): 383–88.
- Hooper NM. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33 (Pt 2): 335–8.
- Jann MW. Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy*. 2000; 20: 1-12.
- Jeandel C, Nicolas MB, Dobois F, et al. Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. *Gerontology*. 1989; 35: 275-82.
- Khachaturian ZS, Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch of Neurol*. 1985; 42: 1097-105.
- Kurz A. The therapeutical potential of tacrine. *J Neural Transm, Suppl*. 1998; 54: 295-299.
- Lipton SA. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5 (2): 160–170.

- Li S, Wang C, Wang W, Dong H, Hou P, Tang Y. Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sci.* 2008 Apr 23;82(17-18):934-42.
- Malberg JE, Blendy JA. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; Dec; 26(12): 631-8.
- Marmigere F., Givalois L., Rage F., Arancibia S., Tapia-Arancibia L. Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus.* 2003; 13: 646–65.
- Nair A., Vadodaria K.C., Banerjee S.B., Benekareddy M., Dias B.G., Duman R.S., Vaidya V.A. Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32: 1504–1519.
- Ohnishi S, Takano K. Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61 (5): 511–24.
- Pacher P and Kecskemeti V. Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics : new drugs, old concern? *Curr Pharm Des.* 2004; 10(20): 2463-75.
- Pratico D, Uryu K, Leight S, et al. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci.* 2001; 21: 4183-7.
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, et al. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* 2006; 26(27): 7212–21.
- Porsolt RD, Deniel M, Jalfre M. Forced swimming in rats: hypothermia, immobility and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol.* 1979; 57(4): 431-6.
- Rodríguez-Franco MI, Fernández-Bachiller MI, Pérez C, et al. Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *J Med Chem.* 2006; 49: 450-462.
- Scarpini E, Scheltens P, Feldman H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol.* 2003; 2: 539-547.
- Schulz V. Safety of St. John's Wort extract compared to synthetic antidepressants. *Phytomed.* 2006; 13: 199-204.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev.* 2001; 81: 741-766.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1985; 85(3): 367-70.
- Sugimoto H. Donepezil hydrochloride: A treatment drug for Alzheimer's disease. *Chem Rec.* 2001; 1: 63-73.
- Tan D-X, Manchester LC, Sainz R, et al. Antioxidant strategies in protection against neurodegenerative disorders. *Expert Opin Ther Pat.* 2003; 13: 1513-1543.
- Ueyama T., Kawai Y., Nemoto K., Sekimoto M., Toné S., Senba E. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain *Neurosci. Res.* 1997; 28: 103–110.

- Wilkinson DG, Francis PT, Schwam E, Payne-Parrish J. Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging*. 2004; 21: 453-478.
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S and Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987; 93(3): 358-64.
- Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997; 134(4): 319-29.
- Xu Y, Ku B, Cui L, Li X, Barish PA, Foster TC, et al. Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. *Brain Research*. 2007; 8: 11629-18.
- Xu Y, Ku B, Tie L, Yao H, Jiang W, Ma X, Li X.,. Curcumin reverse the effect of chronic stress on behavior, the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of CREB. *Brain Res*. 2006; 1122: 56-64.
- Zarotsky V, Sramek JJ, Cutler N R. Galantamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease. *Am J Health-Syst Pharm*. 2003; 60: 446-452.

ภาคผนวก

ก. บทความสำหรับการเผยแพร่

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพ อีกทั้งสภาพภูมิอากาศดังกล่าวมีความเหมาะสมกับการเพาะปลูกพืชพันธุ์ธัญญาหาร ด้วยเหตุนี้เองทำให้ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตอาหารที่สำคัญของโลก โดยเฉพาะผลไม้เขตร้อน เราผลไม้หลายชนิดมาก มีทั้งชนิดที่ออกผลทั้งปี และ ออกตามฤดูกาล ผลไม้ไทยมีรสชาติดีหลายชนิดเป็นที่นิยมของต่างชาติ เป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้สูง นอกจากรสชาติที่อร่อยแล้วผลไม้เหล่านั้นยังอุดมสมบูรณ์ไปด้วยสารอาหารมากมาย เช่น วิตามินและแร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น นอกจากสารอาหารแล้วผลไม้ต่างๆ โดยเฉพาะผลไม้ที่มีสีสียังเป็นแหล่งสำคัญของสารสำคัญ ซึ่งพบในพืชผักต่างๆ และได้มีการ ศึกษากันอย่างกว้างขวางพบว่า สารสำคัญเหล่านี้มีบทบาทในการส่งเสริมสุขภาพและช่วยป้องกันการเกิดโรคต่างๆ

มะปราง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Bouea macrophylla* Griffith เป็นชื่อของผลไม้เมืองร้อนชนิดหนึ่ง ที่อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae (วงศ์เดียวกับ มะม่วง มะกอก ฯลฯ) โดยลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะปราง มีทรงต้นค่อนข้างแหลม มีใบมาก ไม่มีผลัดใบนอก กิ่งก้านแตกแขนงจนทึบ รากแก้วค่อนข้างแข็งแรงมากจึงสามารถทนความแห้งแล้งได้ดี ดอกออกเป็นช่อและก็มีสีเหลืองเมื่อบาน ผลของมะปรางจะมีขนาดพอๆ กับไข่ของนกฟิราบและก็มีสีเหลืองหรือสีเหลืองอมส้มเวลาสุก มีรสชาติหวาน หวานอมเปรี้ยว มะปรางจึงเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในเมืองไทย ในปัจจุบันได้มีความพยายามปรับปรุงพันธุ์ให้มีรสชาติดี และมีขนาดของผลที่ใหญ่ขึ้นเพื่อเพิ่มมูลค่าของตัวสินค้า จากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น พบว่า สารสกัดจากผลมะปรางแสดงศักยภาพที่ดีในการต้าน lipid-peroxidation แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าการศึกษาถึงคุณประโยชน์ต่อสุขภาพในการบริโภคมะปรางนั้นยังมีไม่มากนัก

หมากเฒ่า (มะเฒ่า เฒ่าเสี้ยน มัดเซ) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Antidesma velutinsum* Blume ในวงศ์ Stilaginaceae เป็นผลไม้สมุนไพร สายพันธุ์เดียวกับเบอร์รี่ เป็นผลไม้ขึ้นน้ำในเขตภาคอีสาน ส่วนภาคอื่นๆ เรียกว่า 'เฒ่า' เป็นไม้ยืนต้นไม่ผลัดใบ ความสูงประมาณ 12-15 เมตร ชาวภาคอีสานจะนำหมากเฒ่าสุกที่มีสีดำมาคั้นน้ำให้คนไข้ดื่ม จะช่วยให้ฟื้นไข้เร็ว เป็นพืชที่นิยมมาทำเป็นไวน์ผลไม้ ซึ่งเป็นสินค้าส่งออกที่ต่างชาตินิยมเป็นอย่างมาก กัมมาลและคณะ (2546) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV เชื้อรา เชื้อแบคทีเรียของหมากเฒ่า พบว่าหมากเฒ่ามีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ได้ สมานและสำรี (2549) ได้ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารโพลีฟีนอลในไวน์หมากเฒ่าต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งในระดับห้องทดลองและหนูทดลองพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งในระดับห้องทดลองและหนูทดลองที่ดีกว่าสารโพลีฟีนอลมาตรฐานเคอร์เซติน

คณะนักวิจัยจึงได้ศึกษาถึงผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของมะปรางและหมากเฒ่า โดยมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ต่อโรคทางระบบประสาท เช่น ฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท ผลในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อม และ ผลการต้านภาวะซึมเศร้า นอกจากนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางโภชนาการมากยิ่งขึ้น ทางคณะผู้วิจัยจึงได้วิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์และแร่ธาตุที่เป็นสารอาหารรอง หรือ Trace elements

จากการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อคัดกรองฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัด 4 ชนิด คือ น้ำคั้นจากผลหมากเฒ่า สารสกัดจากผลหมากเฒ่าใน เอทานอล น้ำคั้นจากผลมะปราง และสารสกัดจากผลมะปรางใน เอทานอล พบว่า สารสกัดของผลมะปรางในชั้น เอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แรงที่สุดด้วยค่า $IC_{50} = 73.28 \mu g/ml$ เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างน้ำคั้น และสารสกัดใน เอทานอล พบว่าทั้งสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในชั้น เอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าน้ำคั้น สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดไม่มีฤทธิ์หรือมีฤทธิ์น้อยในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส และจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) ถึงฤทธิ์ในการป้องกันการ

ทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และจาก beta amyloid ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ดีในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาททั้งจากภาวะ oxidative stress และจาก beta amyloid

จากการทดสอบฤทธิ์ในการเพิ่มความจำของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าในชั้น เอทานอล ด้วยวิธี Water maze test พบว่าทั้งสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองได้ เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ในแบบจำลองสัตว์ทดลอง Morris water maze test และ Modified Y-maze test พบว่าสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าสามารถลดเวลาในการหาแผ่นรอง (Escape latency time) ในการทดสอบ Morris water maze ของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Scopolamine นอกจากนี้สารสกัดมะปรางและหมากเฒ่ายังสามารถเพิ่ม % of a new arm entry ในการทดสอบ Modified Y-maze test ของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Scopolamine เพียงอย่างเดียว ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่าทั้งสารสกัดจากผลมะปรางและผลหมากเฒ่ามีผลเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ และสามารถป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ได้ โดยมีผลทั้ง spatial short-term memory (ความจำระยะสั้น) และ spatial long term memory (ความจำระยะยาว)

จากการศึกษาฤทธิ์ด้านภาวะซึมเศร้าในการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถพบว่า มะปรางและหมากเฒ่ามีฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้าได้ทั้งในหนูปกติ และหนูที่ได้รับการเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน ในแบบจำลอง UCMS โดยกลไกการออกฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่า นั้นน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการที่สารสกัดมะปรางและหมากเฒ่าสามารถที่จะเพิ่มการแสดงออกของยีน CREB และ BDNF ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ neurogenesis และ survival ของ neuron ในสมอง โดยเฉพาะส่วน hippocampus และ frontal cortex ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้ การแสดงออกทางด้านพฤติกรรมและอารมณ์ โดยผลของสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่า นั้นให้ผลเช่นเดียวกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine ทั้งในด้านการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า และการยับยั้งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในสมอง

จากผลการศึกษารวบรวมวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่าในสารสกัดจากผลสุกของมะปราง มีแร่ธาตุที่ถูกตรวจพบโดยวิธีการศึกษาในครั้งนี้คือ ทองแดง เหล็ก สังกะสี ลิเทียม ตะกั่ว แคลเซียมและแมกนีเซียม โดยพบในปริมาณที่แตกต่างกันในส่วนของน้ำคั้นและส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล โดยเฉพาะทองแดง และ สังกะสี จะพบปริมาณในน้ำคั้นมากกว่าจากส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล ในขณะที่ปริมาณแร่ธาตุชนิดอื่นพบในปริมาณที่ใกล้เคียงกันในส่วนสกัดทั้งสอง แต่จากการศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและ β -carotene ในสารสกัดผลมะปราง พบว่าในส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล จะพบในปริมาณที่สูงกว่าในส่วนคั้นน้ำมากถึง 13 เท่า ส่วนการศึกษาในสารสกัดจากผลสุกของหมากเฒ่า มีการวิเคราะห์พบแร่ธาตุดังนี้คือ ทองแดง, เหล็ก, สังกะสี, ลิเทียม, ตะกั่ว, แคลเซียม, แมกนีเซียม โดยพบ แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และ สังกะสี ในปริมาณที่สูงทั้งในส่วนคั้นน้ำและส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล โดยปริมาณพบสูงกว่าผลสุกของมะปรางถึง 2-3 เท่า สำหรับ เหล็ก และ ประมาณ 10 เท่าสำหรับ สังกะสี แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและ β -carotene ในสารสกัดผลหมากเฒ่า พบว่ามีปริมาณต่ำมากเมื่อเทียบกับมะปราง โดยสรุปแล้วจากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ได้ข้อมูลในเชิงปริมาณของแร่ธาตุในส่วนสกัดทั้งสองจากผลสุกของมะปรางและหมากเฒ่า โดยจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางโภชนาการเป็นการส่งเสริมการบริโภคผลไม้ไทยทั้งสองชนิด โดยได้ประโยชน์และมีคุณค่าในการบริโภคผลสุกโดยตรงไม่จำเป็นต้องผ่านกรรมวิธีในการดัดแปลง โดยพิจารณาจากผลการศึกษาในส่วนคั้นน้ำที่พบปริมาณแร่ธาตุบางชนิดในปริมาณที่สูง แต่จากการศึกษาเป็นที่น่าสนใจอีกประการก็คือ มีการตรวจพบปริมาณของตะกั่วในส่วนสกัดจาก 95%เอทานอล ของผลไม้ทั้งสอง

ชนิด ซึ่งน่าจะเป็นสิ่งที่ต้องพึงระวังในการบริโภค โดยอาจมาจากขั้นตอนของการเพาะปลูกและแหล่งของดินที่ใช้ในการเพาะปลูกก็เป็นไปได้ ดังนั้นผู้ผลิตควรจะต้องมีการควบคุมมาตรฐานของผลิตภัณฑ์โดยจำเป็นต้องเริ่มต้นตั้งแต่วัตถุดิบที่นำมาใช้เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคต่อไป

ข. กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. Presentation in The 24th Federation Of Asian Pharmaceutical Association (FAPA) Congress 2012
Bali Nusa Dua Convention Center - Bali, Indonesia, September 13 - 16, 2012

SOME TRACE ELEMENTS AND CAROTENOID COMPOSITION OF *BOUEA MACROPHYLLA* GRIFFITH AND *ANTIDESMA VELUTINOSUM* BLUME.

Supawadee Daodee*, Chantana Boonyarat*, Yaowared Chulikhit*

* Division of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khonkaen, Thailand.
csupawad@kku.ac.th

Bouea Macrophylla Griffith and *Antidesma Velutinosum* Blume are tropical fruit trees which can be grown in some parts of Thailand. These fruits are very familiar to consume for Thai people and can be eaten fresh or used in wine but lack of the complete information about their composition. Thus, the objective of this study was to determine some trace elements and carotenoid content in these ripe fruits. The sample solution from these ripe fruits were prepared and extracted by water and ethanol. The amount of some trace elements such as copper, zinc, ferric, lithium and magnesium were analyzed by Atomic absorption spectrophotometry. Total carotenoids and β -carotene content were determined by colorimetric method and HPLC. From trace element analysis, we found that these ripe fruits contained copper, ferric, zinc and lithium in various amount. In addition, the high content of total carotenoids and β -carotene was found in *Bouea Macrophylla*. Thus, the results from this study provide the academic information to promote the consumption of these fruits for health and give the scientific information to further study about the relationship between their composition and biological activities.

Key words: trace elements, carotenoids, β -carotene, atomic absorption spectroscopy, HPLC.

2. . Presentation in The 24th Federation Of Asian Pharmaceutical Association (FAPA) Congress 2012
Bali Nusa Dua Convention Center - Bali, Indonesia, September 13 - 16, 2012

**ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT OF THE FRUITS JUICE AND THE ETHANOLIC EXTRACT FROM ANTIDESMA
VELUTINOSUM IN MICE MODELS OF DEPRESSION**

Yaowared Chulikhit*, Chantana Boonyarat, Supawadee Daodee*

* Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of pharmaceutical Sciences

Khonkaen University, Khonkaen, THAILAND

csupawad@kku.ac.th

Ma Mao (*Antidesma velutinsum*) is a tropical fruit in Thailand. It belongs to the family Phyllanthaceae. Their fruits color varies from red to violet and black. The fleshy and juicy fruits are edible with a sour to bitter sweet taste. Ma mao fruits contain polyphenolic compounds, most prominently anthocyanins, which have antioxidant and anti-inflammatory effects. In addition, anthocyanins have been associated with increased neuronal signaling in brain centers, mediating memory function as well as neuroprotective effects . Previous studies showed that anthocyanins in a dose of 200 mg/kg displayed antidepressive-like activity. The aim of the present study was to investigate the effects of Ma Mao fruit juice and the ethanol extract on antidepressive-like activity in mouse model. One hour after oral administration of Ma Mao juice (250 and 500 mg/kg) and ethanol extract (250 and 500 mg/kg), a tail suspension test (TST) and forced swimming test (FST), models predictive of depression were performed to assess the antidepressant activity. Ma Mao juice and its extracts showed an antidepressant-like effect which was demonstrated by a dose-dependent decrease in the immobility time. The higher immobility time indicates a greater depressive state. The efficacy of the Ma Mao fruits juice and ethanolic extracts were found to be comparable to that of imipramine (25 mg/kg, i.p). The present study provides evidence for an antidepressant-like effect of *Antidesma velutinsum* in mice although the underlying mechanism still remains to be further elucidated. Therefore, a standardized *S. oleraceus* extract or its purified constituents could be of potential interest for the treatment of depressive disorders.

Key words: Ma Mao, *Antidesma velutinsum*, Depression and anthocyanin

3. . Presentation in The 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty:
“Future Trends in Health Products : Safety and Effectiveness for All” Date : 28-30 November 2012 /
Venue : Chiang Mai Orchid Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Effects of *Antidesma Velutinsum* extracts on improvement of memory deficit induced by scopolamine in mice

Pornthip Waiwut¹, Yaowared Chulikhit², Supawadee Daodee², Prasert Reubroycharoen³, Chantana Boonyarat^{2*}

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubonratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khonkean University, Khonkean 40002, Thailand

³Department of Chemical Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

E-mail addresses: chaboo@kku.ac.th

Introduction and Objective

Antidesma velutinsum (Phyllanthaceae), known in Thai as "Ma Mao", is a tropical fruit in Thailand. *Antidesma velutinsum* contains polyphenolic compounds, most prominently anthocyanins, which have antioxidant and anti-inflammatory effects. Therefore, the potential of this plant for Alzheimer's disease has been raised but there are a few *in vivo* evidence to support the therapeutic use. Thus, the aim of our study was to investigate the effects of *Antidesma velutinsum* extracts on neuroprotective activity and on the improvement of cognitive impairment induced by scopolamine via Morris water maze and modified Y maze model.

Methods

Both of fruit juice and the ethanol extract of *Antidesma velutinsum* were screened for their antioxidant activity through the *in vitro* ABTS method. The protective effect against hydrogen peroxide-induced neuronal cell damage was also investigated in cell culture model by MTT assay. Moreover, the effect of the ethanol extract of *Antidesma velutinsum* on the improvement of memory deficit in mice induced by scopolamine was evaluated by 2 behavioral models including Morris water maze and modified Y-maze.

Results

The result exhibited that both of fruit juice and the ethanol extract of *Antidesma velutinsum* showed antioxidant activity by ABTS assay with IC₅₀ values of 0.16 and 0.14 mg/mL, respectively. For protective effect against hydrogen peroxide-induced cell damage, the ethanol extract of *Antidesma velutinsum* was more potent than the fruit juice in the reduction of cell death. For the Morris water maze test which reflects in long-term memory, pretreatment with the ethanol extract of *Antidesma velutinsum* at the concentration of 250 mg/kg/day for 7 days significantly decreased escape latency time when compared with the only scopolamine treated mice. In addition, it also increased % of new arm entry (38.8%) measured by the modified Y-maze which were used as a measure of short-term memory.

Conclusion

All results indicated that the extracts of *Antidesma velutinsum* could improve both short term and long term memory. Thus, the *Antidesma velutinsum* extract might be a potential candidate for further developing as drug for Alzheimer's disease.

Keywords: Ma Mao, *Antidesma velutinsum*, Alzheimer, Behavioral test, Scopolamine

ค. ตารางเปรียบเทียบ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง

Output		หมายเหตุ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ	ผลสำเร็จ (%)	
(6 เดือนที่ 1 และ 6 เดือนที่ 2) <u>การเตรียมสารสกัดหยาบจากผลมะปรางและหมากเฒ่า</u> 1. หั่น และบด ตัวอย่างพืช 2. สกัดตัวอย่างด้วยด้วยน้ำ หรือ 95%เอทานอล (ในการศึกษาได้ทำทั้ง 2 ส่วน) <u>การออกฤทธิ์ของสารสกัดในการฟื้นฟูความจำ</u> 1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส 2. ประเมินความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาท 3. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องจาก Hydrogen peroxide 4. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid 5. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่อง <u>ผลของสารสกัดในการต้านภาวะซึมเศร้า</u> 1. คัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านภาวะซึมเศร้า 2. ศึกษาฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของสารสกัดในแบบจำลองภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน 3. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้าโดยดูถึงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า <u>การวิเคราะห์หาปริมาณTrace elements</u> 1 วิเคราะห์หาปริมาณ Trace elements และ ปริมาณแคโรทีนอยด์	100 100 100 100 100 100 100 100 100	Output ของทุกกิจกรรมเป็นไปตามแผนที่ตั้งเอาไว้ 100 %

ง. ตารางเปรียบเทียบ กิจกรรม ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ทำจริง

กิจกรรม (6 เดือนที่ 1 และ 2)			หมายเหตุ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ	ผลงานที่คาดว่าจะได้รับ (outputs)	กิจกรรมที่ทำจริงเป็นไปตามข้อเสนอของโครง(%)	
<u>การเตรียมสารสกัดหยาบจากผลมะปรางและหมากเฒ่า</u> 1. หั่น และบด ตัวอย่างพืช 2. สกัดตัวอย่างด้วยดว้ยน้ำ หรือ 95% เอทานอล	1. ได้สารตัวอย่างมาเพื่อไว้ทดสอบฤทธิ์	100	กิจกรรมเป็นไปตามแผนที่ตั้งเอาไว้ 100 %
<u>การออกฤทธิ์ของสารสกัดในการฟื้นฟูความจำ</u> 1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส	1. ได้ข้อมูลด้านการออกฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัดตัวอย่าง	100	
2. ประเมินความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาท	2. ได้ข้อมูลด้านการเกิดพิษของสารสกัดตัวอย่าง	100	
3. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องจาก Hydrogen peroxide	3. ได้ข้อมูลด้านการออกฤทธิ์ของสารสกัดตัวอย่างในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress	100	
4. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid			
5. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่อง			
<u>ผลของสารสกัดในการต้านภาวะซึมเศร้า</u> 1. คัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านภาวะซึมเศร้า	1. ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการต้านภาวะซึมเศร้าของสารสกัด	100	
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของสาร	2. ได้ข้อมูลสนับสนุนฤทธิ์ต้าน	100	

สกัดในแบบจำลองภาวะเครียด อย่างอ่อนเป็นระยะเวลา 3. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในการ ต้านซึมเศร้าโดยดูถึงการ แสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ภาวะซึมเศร้า	ภาวะซึมเศร้าในแบบจำลองที่ ใกล้เคียงกับการเกิดโรค ซึมเศร้าในมนุษย์ 3. ได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับกลไก การออกฤทธิ์ของสารสกัด	100	
<u>การวิเคราะห์หาปริมาณTrace elements</u> 1. วิเคราะห์หาปริมาณ Trace elements และ แคโรทีนอยด์	ทราบข้อมูลเชิงปริมาณของ Trace elements และ แคโรที นอยด์	100	

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่น ๆ ต่อสกว.

1. ประชุมกับนักศึกษา/ผู้ช่วยวิจัย หรือนักศึกษาขอพบเพื่อหารือการทำวิจัย 8 ครั้ง
2. ตรวจสอบผลงานวิจัยที่ทำโดยนักศึกษาหรือผู้ช่วยวิจัย 8 ครั้ง
3. ประชุมกับคณะผู้วิจัย 7 ครั้ง

ลงนาม.....

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่ 20 พฤศจิกายน 2555