



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ "ฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พันธุ์
ทองดี และพันธุ์ขนาน้ำผึ้งต่อภาวะความจำบกพร่องและความ
ซึมเศร้า"

โดย นางเยาวเรศ ชูลิขิต และ คณะ

4 เมษายน 2559

สัญญาเลขที่ RDG 5720007

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ "ฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้งต่อภาวะความจำบกพร่องและความซึมเศร้า"

คณะผู้วิจัย

- นางเยาวเรศ ชูลิขิต
- นางสุภาวดี ดาวดี
- นางสาวจันทนา บุญยรัตน์
- นางสาวพรทิพย์ ไวกูม

สังกัด

- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานฉบับนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญเรื่อง	ก
สารบัญภาพ	ข
สารบัญตาราง	ง
สัญลักษณ์และคำย่อ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ช
Executive summary	1
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
บทนำ	5
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	12
วิธีการศึกษาและผลการศึกษา	
1. การเตรียมสารสกัดหยาดและ การควบคุมคุณภาพของสารสกัด โดยวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญรวมของฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แอนโทไซยานินและแคโรทีนอยด์	13
2. การศึกษาฤทธิ์สารสกัดจากผลส้มโอ 3 พันธุ์ในการป้องกันและฟื้นฟู ภาวะความจำเสื่อม	17
3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ในการต้านภาวะซึมเศร้า	30
วิจารณ์ผลการศึกษา	61
สรุปและข้อเสนอแนะ	63
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก	
บทความสำหรับการเผยแพร่	69
กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์	73
ตารางเปรียบเทียบ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง	75
ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง	76

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐาน	

เคอซิตินที่ความเข้มข้นต่างๆ	16
รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐาน เบต้า-แคโรทีนที่ความเข้มข้นต่างๆ	17
รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ	17
รูปที่ 4 ผลของ trolox ในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay	25
รูปที่ 5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดส้มโอ	27
รูปที่ 6 ผลของ hydrogen peroxide ต่อการตายของเซลล์ SH-SY5Y	28
รูปที่ 7 ผลของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องมาจาก Hydrogen peroxide	29
รูปที่ 8 ผลของ beta amyloid 1-42 ต่อการตายของเซลล์ C6	30
รูปที่ 9 ผลของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจาก beta amyloid	31
รูปที่ 10 ผลของ Hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มกับเซลล์เป็นเวลา 10 และ 30 นาทีต่อการแสดงออกของโปรตีน	32
รูปที่ 11 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทองดี พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และพันธุ์ทับทิม สยาม ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ แบบ apoptosis ในเซลล์ C6 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย hydrogen peroxide	33
รูปที่ 12 ผลของสารสกัดจากส้มโอ 3 สามพันธุ์ คือพันธุ์ทับทิมสยาม พันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง (KP) ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ในเซลล์ C6 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย beta-amyloid	34
รูปที่ 13 ผลของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการ เรียนรู้และความจำ	35
รูปที่ 14 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (TS) และ tacrine ต่อการฟื้นฟูเรียนรู้และความจำในการทดสอบ Morris water maze	36
รูปที่ 15 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (TS) ต่อการฟื้นฟูการ เรียนรู้และความจำในการทดสอบด้วย Y-Maze test	37
รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานของสารละลาย 4-hydroxyquinoline	47
รูปที่ 17 ผลของสารสกัดส้มโอในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A	47
รูปที่ 18 ผลของ clorgyline ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A	48
รูปที่ 19 ผลของสารสกัดส้มโอในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A	49
รูปที่ 20 ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 ug/mL ในการยับยั้งเอนไซม์ MAO-B	50
รูปที่ 21 ผลของ deprenyl ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B	51
รูปที่ 22 ผลของสารสกัดส้มโอในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B	52
รูปที่ 23 ฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าในหนูเมาส์เพศผู้โดย Tail Suspension Test	53
รูปที่ 24 ฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าในหนูเมาส์เพศผู้โดย Forced swimming Test	54
รูปที่ 25 ผลของสารสกัดส้มโอต่อ locomotor activity	55
รูปที่ 26 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการบริโภคน้ำตาล	55
รูปที่ 27 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการลดภาวะซึมเศร้าในแบบจำลอง	

Tail suspension test ในหนู UCMS	56
รูปที่ 28 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการลดภาวะซึมเศร้าในแบบจำลอง Forced swimming test ในหนู UCMS	57
รูปที่ 29 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อ Locomotor activity ของ หนูเม้าส์ที่ได้รับ UCMS	58
รูปที่ 30 ผลของส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามต่อการแสดงออกของ BDNF และ NPY mRNA ในสมองส่วน frontal cortex	59
รูปที่ 31 ผลของส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามต่อการแสดงออกของ BDNF และ NPY mRNA ในสมองส่วน hippocampus	60

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ และ แคโรทีนอยด์ ที่พบในสารสกัด เอทานอลของผลส้มโอ	16
ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดส้มโอ และสารมาตรฐาน tacrine ต่อการยับยั้งเอนไซม์ อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส	24
ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอ และสารมาตรฐาน trolox ต่อการกำจัด อนุมูลอิสระ DPPH	25
ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอ และสารมาตรฐาน trolox ต่อการกำจัด อนุมูลอิสระ ABTS ^{•+}	26
ตารางที่ 5 Summary of the primer pair for house keeping gene (β -actin), stress-related genes (BDNF, NYP) and product length.	45
ตารางที่ 6 ค่า IC ₅₀ ของสารสกัดส้มโอในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A	49
ตารางที่ 7 ค่า IC ₅₀ ของสารสกัดส้มโอในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B	51
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอทองดี และทับทิมสยาม ในการยับยั้ง	

สัญลักษณ์และคำย่อ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
Ach	Acetylcholine
Akt	Protein kinase B
ANOVA	Analysis of variance
ATCI	acetylthiocholine iodide
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
Bp	Base pair
CMS	Chronic mild stress
DF	Dilution factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Deoxynucleotide
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
ECL	Enhanced chemiluminescence
FST	Forced swimming test
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HPA axis	Hypothalamic-pituitary-adrenal axis
HRP	Horseradish peroxidase
IC ₅₀	50% Inhibition concentration
IL	Interleukin

i.p.	Intraperitoneal
IMP	Imipramine
KN	KaoNumPueng
MAO-A	Monoamine oxidase A
MAO-B	Monoamine oxidase B
mL	Millilitre
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MW	Molecular weight
MWM	Morris water maze
ND	Not determined
nM	Nano molar
NPY	Neuropeptide Y
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PARP1	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
S.E.M.	Standard error of mean
TD	Thong Dee
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
tRNA	Total ribonucleic acid
TS	Tubtim Siam
TST	Tail suspension test
UCMS	Unpredictable chronic mild stress
μ g	Microgram
μ L	Microlitre
μ M	Micromolar
£	Molar extinction coefficient

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัยและขอขอบคุณบุคลากรที่ดำเนินงานในสำนักประสานงานวิจัยและพัฒนาสมุนไพรเพื่อคุณภาพชีวิตทุกท่านที่ช่วยประสานงานจนกระทั่งงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สัญญาเลขที่ RDG5720007

โครงการ "ฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้งต่อภาวะ
ความจำบกพร่องและความซึมเศร้า"

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ส่วนที่ 1 ข้อมูลโครงการ

ชื่อผู้รับทุน ดร.เยาวเรศ ชูลิขิต

โครงการเริ่มเมื่อวันที่ 15 พฤศจิกายน 2556-15 พฤศจิกายน 2558 รวมเวลาที่ทำวิจัยทั้งสิ้น 24 เดือน

ส่วนที่ 2 รายงานเนื้อหา

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive summary)

จากการศึกษาพบว่าปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างออกมามากกว่าปกติในร่างกายมีผลเกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดพยาธิสภาพต่างๆในร่างกาย เช่นภาวะสมองขาดเลือด ภาวะเส้นเลือดในสมองตีบตันหรือแตก ภาวะการอักเสบ รวมถึงโรคทางระบบประสาทเช่นอัลไซเมอร์ พาร์กินสัน และ โรคซึมเศร้า แต่สาเหตุต่างๆ เหล่านี้สามารถป้องกันได้ จากข้อมูลงานวิจัยและระบาดวิทยา พบว่าการบริโภคผักผลไม้เป็นประจำสามารถลดอัตราเสี่ยงและเพิ่มอัตราการป้องกันการเกิดโรคเหล่านี้ได้ ซึ่งผลดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประเภทวิตามินซี เบต้า-แคโรทีน แคโรทีนอยด์ รวมทั้งสารกลุ่มโพลีฟีนอลิก จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าส้มโอซึ่งเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายและมีศักยภาพในการส่งออกของประเทศไทย มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดี การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาผลของสารสกัดจากผลส้มโอ 3 ชนิดคือ ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ต่อโรคทางระบบประสาท เช่นศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท ผลในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อม และ ผลการต้านภาวะซึมเศร้า และทำการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์และแอนโทไซยานิน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความเชื่อมโยงระหว่างปริมาณสารสำคัญต่างๆเหล่านี้และฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ

การทดลองในหลอดทดลองเพื่อคัดกรองฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชั่น และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัด 3 ชนิด คือ สารสกัดผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ทองดี และทับทิมสยาม พบว่าสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น แรงที่สุดทั้งใน model ABTS assay และ DPPH assay สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส และจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงถึงฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และ beta amyloid ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 พันธุ์มีฤทธิ์ดีในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และจาก beta amyloid และจากการศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแบบจำลองสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีผลป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ได้ โดยมีผลทั้ง spatial short-term memory (ความจำระยะสั้น) และ spatial long term memory (ความจำระยะยาว)

ส่วนผลการศึกษาผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B พบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และทับทิมสยาม มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ

MAO-B ในขณะที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งนั้นไม่มีศักยภาพเพียงพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองตัว และจากการทดสอบและคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี tail suspension test และ forced swimming พบว่า เฉพาะสารสกัดส้มโอทับทิมสยามเท่านั้น ที่ลดค่า immobility time ได้ทั้งสองแบบทดสอบ ส่วนสารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งนั้นไม่มีผลในการลดพฤติกรรมซึมเศร้าได้เลยจากทั้ง 2 แบบทดสอบ ส่วนผลการศึกษาด้านภาวะซึมเศร้าในแบบจำลอง UCMS ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามสามารถลดพฤติกรรมซึมเศร้าเช่น ภาวะสิ้นยินดี (anhedonia) และ ภาวะสิ้นหวัง (hopeless) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับ ความเครียด และให้ผลใกล้เคียงกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine โดยกลไกในการต้านภาวะซึมเศร้าของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามน่าจะมาจากการที่สารสกัดสามารถเพิ่มการแสดงออกของ BDNF mRNA ได้ทั้งในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex และอาจจะเกี่ยวข้องกับการที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการปกป้องสมอง พื้นฟูความจำ และฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ สอดคล้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารสำคัญในสารสกัดของผลส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลการทดสอบฤทธิ์ในการปกป้องสมอง พื้นฟูความจำ และฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ สอดคล้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารสำคัญในสารสกัดของผลส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่พบว่า ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม มีปริมาณสารสำคัญจำพวกฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ และ แอนโทไซยานิน มากที่สุด รองลงมาคือพันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้งตามลำดับ และจากข้อมูลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางโภชนาการมากยิ่งขึ้น ทำให้ทราบถึงคุณประโยชน์ของการบริโภคผลไม้ไทยอย่างแท้จริง โดยเฉพาะในแง่ของการป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมอันมีสาเหตุเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ หรือภาวะเครียดออกซิเดชั่น โดยผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลและหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อเพิ่มมูลค่าของส้มโอ พร้อมทั้งส่งเสริมให้ผู้บริโภคได้เห็นความสำคัญของผลไม้ชนิดนี้ โดยเฉพาะประโยชน์ด้านโภชนาบำบัด และการช่วยป้องกันการเกิดโรคทางสมองและระบบประสาทต่างๆ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อคัดกรองฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ชาวน้ำผึ้ง ทองดี และทับทิมสยาม พบว่าสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แรงที่สุดทั้งใน model ABTS assay และ DPPH assay สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส และจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 พันธุ์มีฤทธิ์ดีในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และจาก beta amyloid และฤทธิ์ในการป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแบบจำลองสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีผลป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ได้ โดยมีผลทั้ง spatial short-term memory (ความจำระยะสั้น) และ spatial long term memory (ความจำระยะยาว)

ส่วนผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B พบว่า สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และทับทิมสยาม มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ในขณะที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ชาวน้ำผึ้งนั้นไม่มีศักยภาพเพียงพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองตัว และจากการทดสอบและคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี tail suspension test และ forced swimming พบว่า เฉพาะสารสกัดส้มโอทับทิมสยามเท่านั้น ที่ลดค่า immobility time ได้ทั้งสองแบบทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ส่วนสารสกัดส้มโอพันธุ์ชาวน้ำผึ้งนั้นไม่มีผลในการลดพฤติกรรมซึมเศร้า จากทั้ง 2 แบบทดสอบ ส่วนผลการศึกษาการต้านภาวะซึมเศร้าในแบบจำลอง UCMS ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามสามารถลดพฤติกรรมซึมเศร้าเช่น ภาวะสิ้นยินดี (anhedonia) และ ภาวะสิ้นหวัง (hopeless) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดและได้รับน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว และลดความเครียดได้ใกล้เคียงกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine โดยกลไกในการต้านภาวะซึมเศร้าของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามน่าจะมาจากการที่สารสกัดสามารถเพิ่มการแสดงออกของ BDNF mRNA ได้ทั้งในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex และอาจจะเกี่ยวข้องกับการที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการปกป้องสมอง พื้นฟูความจำ และฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ สอดคล้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารสำคัญในสารสกัดของผลส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ที่พบว่าส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม มีปริมาณสารสำคัญจำพวกฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ และ แอนโทไซยานินมากที่สุด รองลงมาคือพันธุ์ทองดีและชาวน้ำผึ้งตามลำดับ

คำสำคัญ : ความจำบกพร่อง, ภาวะซึมเศร้า, ส้มโอ, สารต้านออกซิเดชัน

Abstract

The present study was aimed to screening the antioxidant and inhibitory effect on acetylcholinesterase activities of three varieties pomelo, KaoNampueng (KN), ThongDee (TD) and TubtimSiam (TS). The result exhibited that TS extract had the strong activities in ABTS and DPPH model. However, three cultivars did not show the inhibitory effect on acetylcholinesterase activity. In cell culture base assay, KN, TD and TS extracts showed the neuroprotection against oxidative stress and beta amyloid toxicity. TS extract improved the cognitive impairment in short-term and long term memories in scopolamine-induced mice.

In the model of depression, only TD and TS extratcs inhibited the MAO-A and MAO-B activities, whereas KN extract had no the potential to inhibit the activity of MAO enzymes. Screening for antidepressant activity in normal mice, only TS extract significantly reduced the immobility time in both of tail suspension test and forced swimming test without the effect on locomotor activity when compare with the non-stress control group. KN extract had no effect on depression. Therefore, TS was used in the unpredictable chronic mild stress (UCMS) mice model. The results demonsrtated that TS extract significantly decreased the anhedonia and hopeless behaviors which were the main symptom in depression when compare with UCMS mice. The antidepressant activity of TS extract was similar to imipramine, reference antidepressant drug. The plausible mechanisms may be involved in the increasing of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus and frontal cortex and the inhibitory effect on MAO-A and MAO-B.

The neuroprotective effects of three varieties pomelo, KN, TD and TS were related to the amount of active constituents such as total flavonoids, total phenolic contents, carotenoids and anthocyanin contents. The highest amount of total flavonoids, total phenolic contents, carotenoids and anthocyanin contents were found in TS, TD and KN respectively.

Keywords : cognitive impairment, depression, pomelo, antioxidant agent

บทนำ

จากการศึกษาพบว่าปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างออกมามากกว่าปกติในร่างกายมีผลเกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดโรคและพัฒนาการของโรคหลายชนิด โดยเฉพาะโรคทางระบบประสาทและการส่งสัญญาณสื่อประสาท (เช่นโรคอัลไซเมอร์ โรคซึมเศร้า และ โรคพาร์กินสัน) โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน และโรคที่เกิดจากการเสื่อมสลายตามอายุ (Di Giacomo CD *et al*, 2003) อนุมูลอิสระ คือสารซึ่งมีอิเล็กตรอนซึ่งไม่มีคู่ออยู่ในวงรอบของอะตอม หรือโมเลกุล ทำให้มีความว่องไวอย่างมากในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นในร่างกาย อนุมูลอิสระที่พบในร่างกายมีหลายชนิดเช่น อนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น อนุมูลไฮดรอกซี อนุมูลเปอร์ออกซี และ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลอิสระชนิดอื่นที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น อนุมูลอิสระกลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น ไนตริกออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ และอนุมูลกลูตาไธอิล และอนุมูลเมทิล โดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการหายใจ กระบวนการเผาผลาญพลังงาน และร่างกายก็จะมี ระบบการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ด้วยสารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนท์ เช่น กลูต้าไธโอน 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 คาร์บอนหรือ ก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ ถ้าสารเหล่านี้มีมากกว่าความสามารถของสารต้านออกซิเดชั่นในร่างกายจะขจัดหมด หรือในภาวะที่จำนวนสารต้านออกซิเดชั่นในร่างกายลดลง ก็จะทำให้ร่างกายเกิดภาวะที่ไม่สมดุล ที่เรียกว่าภาวะเครียดออกซิเดชั่นเกิดขึ้น (Floyd RA and Hensley K., 2002) อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน (โดยเฉพาะ low density lipoprotein) โปรตีน หน่วยสารพันธุกรรม ดีเอ็นเอ และคาร์โบไฮเดรต ทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด มีผลเกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดพยาธิสภาพต่างๆในร่างกาย เช่น ภาวะสมองขาดเลือด, ภาวะเส้นเลือดในสมองตีบตันหรือแตก โรคเมเร็งบางชนิด, โรคไขข้ออักเสบ, ภาวะการอักเสบและภาวะช็อคจากการติดเชื้อ รวมทั้งโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของระบบประสาท โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน และโรคซึมเศร้า (Jeandel C *et al*, 1989 and Di Giacomo CD *et al*, 2003) นอกจากนี้ในสภาวะที่มีอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ปริมาณมากร่วมกับสภาวะออกซิไดซ์ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion) จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์เกิดเป็นเปอร์ออกซีไนไตรท์ (ONOO⁻) ซึ่งมีความไวในการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้เร็วกว่า จึงมีความเป็นพิษสูงและมีฤทธิ์ทำลายสารชีวโมเลกุลอื่นได้มากกว่า จึงมีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ เหล่านี้ได้รุนแรงขึ้น ดังนั้นการกำจัดหรือการยับยั้งการสังเคราะห์อนุมูลอิสระน่าจะเป็นวิธีการหนึ่งที่สำคัญที่ช่วยลดการเกิดพยาธิสภาพเหล่านี้ลง

สารที่มีบทบาทอย่างมากคือสารต้านอนุมูลอิสระ ในทางเคมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่น ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ ๒ ทาง คือ ช่วยลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายและ ลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ แม้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถแก้ไขความเสียหายที่เกิดขึ้นแล้ว แต่สามารถชะลอให้ความเสียหาย เกิดช้าลงได้โดยเฉพาะโรคเรื้อรังซึ่งเป็นผลลัพธ์สะสมที่เกิดจากเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกายถูกทำอันตรายและเสียหายเป็นปี (โดยมากเป็นเวลาหลายสิบปี) เห็นได้จากการรวบรวมความชุกของโรคว่าโรคไม่

ติดต่อเรื้อรัง เป็นมากในผู้ใหญ่วัยกลางคนหรือผู้สูงอายุ ดังนั้นบุคคลทุกเพศทุกวัยจึงควรได้รับสารต้านอนุมูลอิสระให้พอเพียงต่อความต้องการในแต่ละวัน เพื่อให้เกิดความสมดุลในร่างกายระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น

แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีมากตามธรรมชาติพบได้ทั้งในอาหาร พืช ผัก และผลไม้ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี ซีลีเนียม เบตาแคโรทีน วิตามินเอ พฤษาเคมีต่างๆ (phytochemicals) เช่น สารประกอบฟีนอลิก (polyphenol) จากชาและสมุนไพบบางชนิด ไอโซฟลาโวน (isoflavones) จากถั่วเหลือง เป็นต้น เพื่อให้ร่างกายได้รับสารต้านอนุมูลอิสระพอเพียงกับความต้องการ เราควรกินผักผลไม้สดเป็นประจำ เพราะผักและผลไม้เหล่านี้มีสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติเป็นส่วนประกอบอยู่มากมาย ทั้งนี้เพื่อเป็นการส่งเสริมการมีสุขภาพที่ดี แข็งแรงอยู่เป็นประจำ

จากรายงานการศึกษาวิจัยทางด้านประสาทวิทยาอย่างมากในปัจจุบัน ทำให้ทราบว่าการเสื่อมของเซลล์ประสาทจากการที่มีการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินไป มีบทบาทอย่างมากในการทำให้เกิดพยาธิสภาพทางสมอง มีส่วนทำให้เซลล์ประสาทไม่เจริญเติบโต โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคหนึ่งที่มีการทำลายเซลล์ประสาทอันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระในปริมาณสูงซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการทางสมองเสื่อมในผู้สูงอายุ 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 โดยพบว่าอาจเกี่ยวข้องกับการลดลงของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีน (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) อธิบายว่าสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคอัลไซเมอร์อาจเกิดจากความผิดปกติของระบบสื่อสารประสาทของอะเซทิลโคลีน โดยพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์จะมีระดับของอะเซทิลโคลีนลดลงอย่างมาก ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ความสามารถในการจำและการใช้เหตุผลของผู้ป่วยลดลง (Wilkinson DG *et al*, 2004) ปริมาณสารอะเซทิลโคลีนนี้ ส่วนหนึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยอะเซทิลโคลีนทำให้สารสื่อประสาทนี้มีปริมาณน้อยลงในสมอง ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนายาซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งจะทำให้มีสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนในสมองเพิ่มมากขึ้นทำให้ช่วยฟื้นฟูความจำที่บกพร่อง (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) โปรตีนนี้เป็นทรานสมเมเบรนโปรตีน (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 แต่ยาในกลุ่มนี้ยังอยู่ในขั้นตอนการศึกษาและพัฒนา ยังไม่มีการนำมาใช้ในทางคลินิก

สมมติฐานโปรตีนเทา (tau hypothesis) สมมติฐานนี้เชื่อว่าโปรตีนเทาที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไป (hyperphosphorylated tau) จะจับคู่กับโปรตีนเทาปกติสายอื่นๆ เกิดเป็น neurofibrillary tangles สะสมภายในตัวเซลล์ประสาท (Goedert M *et al*, 1991) ผลดังกล่าวทำให้ไมโครทิวบูลสลายตัวและทำลายระบบการขนส่งสารในเซลล์ประสาท 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 เป็นขบวนการที่สำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ 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 ประกอบกับภาวะเศรษฐกิจที่ย่ำแย่ ในปัจจุบัน ได้ส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิต สภาพความเป็นอยู่ และสภาพจิตใจของประชาชนเป็นอย่างมาก ทำให้เกิดความเครียด ความวิตกกังวล ภาวะซึมเศร้า โรคทางจิตต่างๆ โดยที่บางครั้งประชาชนอาจไม่รู้ตัว จนกระทั่งความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้น ก่อให้เกิดปัญหาการฆ่าตัวตายตามมา ปัญหาการฆ่าตัวตายมีปัจจัยจากหลายสาเหตุ สาเหตุหลักของการฆ่าตัวตายคือ การป่วยเป็นโรคซึมเศร้า (depressive disorder) ปัจจุบันมีผู้ป่วยด้วยโรคซึมเศร้าในประเทศไทย 5% ของจำนวนประชากรทั้งหมด หรือกว่า 3 ล้านคน ซึ่งถือว่าค่อนข้างมาก และนำไปสู่การสูญเสียสมรรถภาพของบุคคลและเศรษฐกิจ สังคม ความสูญเสียทางสุขภาพที่เกิดจากโรคซึมเศร้านี้ WHO (2001) ได้จัดลำดับโรคทางจิตเวชอยู่ใน 20 อันดับแรกถึง 3 โรคซึ่งเป็นกลุ่มที่นำไปสู่การมีคุณภาพชีวิตที่แย่ (Disease burden) และได้ประมาณการว่า โรคซึมเศร้ารุนแรงจะเป็นภาระต่อสังคมเศรษฐกิจ จากอันดับ 7 ในปี 1990 เป็นอันดับ 1 เคียงคู่กับโรคหัวใจขาดเลือด ในปี 2020 ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่สังคมเร่งตระหนักว่า ภาวะซึมเศร้าเป็นโรคหนึ่ง ซึ่งไม่ใช่นิสัยหรือ กิวัตรปกติของคนๆ หนึ่ง (รณชัย คงสกนธ์ และคณะ, 2548)

กลไกการเกิดโรคซึมเศร้า ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด สมมติฐานหนึ่งคือ มีการลดลงอย่างมากของระดับสารสื่อประสาทจำพวก serotonin ทำให้ส่งผลต่อการแสดงออกทางด้านพฤติกรรม อีกหนึ่งทฤษฎีที่แพร่หลายเป็นอย่างมากในปัจจุบันคือ neurotrophic theory ซึ่งเป็นทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์ประสาทที่ลดลง พร้อมทั้งมีการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ทำงานเกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า หนึ่งในกลไกที่เชื่อว่ามีส่วนสำคัญในการเสื่อมของเซลล์ประสาทคือ การเพิ่มขึ้นของ glutaminergic transduction และมีการเพิ่มขึ้นอย่างมากของกลูตาเมต ส่งผลให้เกิด excitotoxicity ได้ การกระตุ้น glutamate neuron เป็นระยะเวลานานพบว่า จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างมากของอนุมูลอิสระ จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคซึมเศร้า 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) ซึ่งเป็นระบบที่ควบคุมเกี่ยวกับการตอบสนองต่อภาวะความเครียด ส่งผลให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระมากขึ้นไปอีก อนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปทำให้เกิดความเสื่อมของเซลล์ประสาท โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ประสาทชนิด serotonergic neuron ซึ่งมีผลอย่างมากต่อ serotonergic activity ซึ่งผู้ป่วยที่มีอาการของโรคซึมเศร้าพบว่าจะมี serotonergic activity ลดลง และมีการเสื่อมของเซลล์ประสาทชนิด serotonergic neuron และเซลล์ประสาทอื่นๆใน hippocampus area มีการลดลงของกระบวนการ neurogenesis และมีการเพิ่มขึ้นของกระบวนการ neurodegeneration (Catena-Dell'osso M *et al.*, 2010)

การรักษาโรคซึมเศร้า ประกอบด้วยการรักษาหลายแบบ เช่น จิตบำบัด การเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม การให้คำแนะนำ และการจัดการกับความเครียดที่เป็นสาเหตุของโรคร่วมกับการให้กำลังใจ ประคับประคองทางจิตใจ ในรายที่เป็นไม่รุนแรง ส่วนในรายที่เป็นรุนแรงอาจต้องมีการได้รับยาอย่างสม่ำเสมอ หรือเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล ยาด้านภาวะซึมเศร้าที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันแบ่งได้เป็นหลายชนิดด้วยกัน 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 ทั้งนี้

เนื่องจากว่ายาในกลุ่มนี้มีพิษต่อระบบหัวใจน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม จากการติดตามอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา พบว่าการใช้ยาในกลุ่มนี้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานมีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดหัวใจเต้นผิดจังหวะ และคลื่นไฟฟ้าหัวใจผิดปกติ ในคนไข้ที่ไม่เคยมีประวัติโรคหัวใจมาก่อน ดังนั้น จึงเริ่มมีการทบทวนถึงความปลอดภัยในการใช้ยาในกลุ่มนี้มากขึ้น (Pacher P et. al, 2004)

ปัจจุบันแนวความคิดค้นและพัฒนาายากลุ่มใหม่เพื่อนำมาใช้รักษาโรคซึมเศร้า จึงมุ่งเน้นไปหาสารจากธรรมชาติมากขึ้น เนื่องจากสารจากธรรมชาติ สมุนไพร มีการใช้มานาน และกว้างขวาง มีความปลอดภัยสูง สารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิด ถูกนำมาเป็นสารต้นแบบในการพัฒนายาใหม่มากมาย St. John's wort (*Hypericum perforatum*) เป็นพืชสมุนไพรตัวแรกที่ถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ด้านการซึมเศร้าที่ดี และมีผลข้างเคียงน้อย ในช่วงสิบกว่าปีมานี้ 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 จากการศึกษาของ 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 และผลไม้ไทยก็เป็นผลไม้ที่มีสารต้านออกซิเดชันสูงอีกด้วย จึงควรส่งเสริมการบริโภคผลไม้ไทยเพื่อให้เกิดโภชนาการที่ดี ส่งผลสุขภาพที่ดีทั้งกายและใจ

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

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

ส้มโอเป็นผลไม้ในตระกูลส้มที่ปลูกได้ดีในประเทศไทย และเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่มีศักยภาพในการส่งออก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Citrus maxima* (Burm.) Merrill เป็นพืชในวงศ์ Rutaceae โดยลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของส้มโอเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก แตกกิ่งก้านต่ำ กิ่งก้านแผ่ มีหนาม ใบเดี่ยว รูปไข่ถึงรูปรี โคนใบกลมถึงรูปหัวใจ ปลายใบแหลมและเว้า ขอบใบเรียบหรือหยักเป็นคลื่นตื้นๆ ช่อดอกออกตามซอกใบเป็นกระจุก ดอกมีกลิ่นหอม กลีบเลี้ยง 5 กลีบสีเขียว กลีบดอก 5 กลีบสีขาว เกสรเพศผู้ 10 ผลกลมโต บางพันธุ์ตรงข้ามมีจุดสูงขึ้นมา ผิวผลเมื่อยังอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จัดเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง ผิวของผลไม่เรียบ ผิวของเปลือกผลมีต่อมน้ำมันกระจายทั่วไป ภายในผลเป็นช่อง ๆ มีแผ่นบาง ๆ สีขาวกั้นเนื้อให้แยกออกจากกัน เนื้อแต่ละส่วนเรียกว่า "กลีบ" มีรสหวานหรือหวานอมเปรี้ยว มีเมล็ดฝังอยู่ระหว่างเนื้อมากกว่า 1 เมล็ด ผลส้มโอมีเปลือกหนาทำให้สามารถเก็บรักษาได้นาน ส้มโอเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในเมืองไทยในปัจจุบัน ได้มีความพยายามปรับปรุงพันธุ์ให้มีรสชาติ และมีขนาดของผลที่ใหญ่ขึ้นเพื่อเพิ่มมูลค่าของส้มโอ ปัจจุบันพันธุ์ส้มโอที่เป็นที่นิยมปลูกทางการค้าได้แก่ พันธุ์ขาวพวงซึ่งมีผลกลม มีจุดสูง ผิวเรียบ สีเปลือกเขียวอ่อนอมเหลือง มีเมล็ดน้อย เป็นพันธุ์ดั้งเดิม พันธุ์ทองดี ผลโต กลมแป้น ไม่มีจุด ที่ขั้วมีจิบเล็กน้อย รสหวาน ฉ่ำน้ำ เนื้อสีชมพู พันธุ์ขาวน้ำผึ้งมีผลใหญ่ กลมสูง ก้นเรียบ พันธุ์ขาวแตงกวา ผลขนาดกลาง กลมแป้น เปลือกบาง เนื้อสีขาว และพันธุ์ทับทิมสยาม ซึ่งลักษณะผลมีขนาดใหญ่ มีจุดสูง เปลือกบาง เนื้อสีชมพู

มีรายงานวิจัยพบว่าส้มโอมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Tanizawa et al., 1992) โดยพบสาร beta-carotene, lycopene, vitamin E, catechins และ flavonoids จากส่วนเนื้อที่รับประทานได้ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Charoensiri et al., 2009) จากการศึกษาในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนู พบว่าน้ำคั้นที่ได้จากส้มโอสามารถลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูที่ได้รับยาต่อออกซิเจนอิสระ, ลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดส, และยังเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดยาออกจากเซลล์ นอกจากนี้จากการทดสอบฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอในเซลล์บุพร่องหลอดเลือดมนุษย์ พบว่าการให้ น้ำคั้นส้มโอควบคู่ไปกับอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 35 วัน จะช่วยลดความแก่ของเซลล์ได้ (Chularojmontri et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าการศึกษาดังกล่าวถึงคุณสมบัติต่อสุขภาพในการบริโภคส้มโอนั้นยังมีไม่มากนัก

จากข้อมูลการศึกษารวบรวมของคณะผู้วิจัยที่ได้รับทุนจากสกว.ฝ่ายเกษตร ปี 2554-2555 ซึ่งได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของผลไม้ไทยคือมะปรางและหมากเฒ่าต่อภาวะความจำบกพร่องและภาวะซึมเศร้า พบว่าสารสกัดจากผลมะปรางและหมากเฒ่าแสดงฤทธิ์ต่อระบบประสาทที่ดี เช่น มีฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท มีฤทธิ์ในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อม และ มีฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้า อีกทั้งพบว่าฤทธิ์ปกป้องสมองของมะปรางและหมากเฒ่าสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น ปริมาณสารประกอบคาโรทีนอยด์และฟีนอลิกในสารสกัดมะปรางและหมากเฒ่า (ข้อมูลจากรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของนางสุภาวดี ดาวดี และคณะ ที่ได้รับทุนจากสกว.ฝ่ายเกษตร ปี 2554-2555) จากข้อมูลการวิจัยดังกล่าวจึงคาดว่าผลไม้ไทยอื่นอีกหลายชนิด ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีประเภทโพลีฟีนอลิก น่าจะมีศักยภาพในการป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ได้ โดยเฉพาะโรคทางระบบประสาท คณะนักวิจัยจึงเล็งเห็นว่าควรมีการศึกษาค้นคว้าถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของกลุ่มผลไม้ไทยอย่างเป็นระบบในเชิงวิทยาศาสตร์ มีการวิจัยอย่างต่อเนื่อง จึงสนใจที่จะขยายงานวิจัยให้ครอบคลุมผลไม้ชนิดอื่นของไทย จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าสารสกัดจากผลส้มโอแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นซึ่งเป็นกระบวนการที่มีความเชื่อมโยงกับภาวะผิดปกติในร่างกายดังที่ได้กล่าวไปแล้ว

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ คณะนักวิจัยจึงเล็งเห็นว่าควรมีการวิจัยต่อเนื่องถึงผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของส้มโอ โดยมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ต่อโรคทางระบบประสาท เช่น ฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท ผลในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อม และ ผลการต้านภาวะซึมเศร้า โดยส้มโอที่คัดเลือกมาศึกษาคือ ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดี

นอกจากนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางโภชนาการมากยิ่งขึ้น ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์และแอนโทไซยานิน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความเชื่อมโยงระหว่างปริมาณสารสำคัญต่างๆเหล่านี้และฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ซึ่งจะทำให้ทราบถึงคุณประโยชน์ของการบริโภคผลไม้ไทยอย่างแท้จริง โดยเฉพาะในแง่ของการป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุอันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ โดยผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลและหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อเพิ่มมูลค่าของผลไม้ไทยในการส่งออก พร้อมทั้งส่งเสริมให้ผู้บริโภคได้เห็นความสำคัญของผลไม้ชนิดนี้ โดยเฉพาะประโยชน์ในแง่โภชนาการ และการช่วยป้องกันการเกิดโรคต่างๆ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเตรียมสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง รวมถึงวิเคราะห์หาปริมาณและควบคุมคุณภาพสารสกัดในเชิงปริมาณรวมของฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แคโรทีนอยด์ และแอนโทไซยานิน
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 เพื่อศึกษาผลของสารสกัด ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ โดยวิธี western blotting analysis
 - 2.6 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องจากได้รับ scopolamine ในหนูเม้าส์ โดยวิธี Y-maze
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านภาวะซึมเศร้า
 - 3.1 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase A และ B (MAO-A และ MAO-B)
 - 3.2 เพื่อคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านภาวะซึมเศร้าโดยใช้แบบจำลอง tail suspension test และ/หรือ Forced swimming test
 - 3.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดในการต้านภาวะซึมเศร้าโดยใช้แบบจำลองภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน (UCMS)
 - 3.4 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมซึมเศร้า

วิธีการศึกษาและผลการศึกษา

1. การเตรียมสารสกัดหยาบและ การควบคุมคุณภาพของสารสกัดโดยวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญรวมของฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แอนโทไซยานินและแคโรทีนอยด์

การศึกษาในครั้งนี้ เป็นการเตรียมสารสกัดหยาบและทำการศึกษาเฉพาะในส่วนของการใช้ในการรับประทานเท่านั้นหรือที่เรียกว่า ส่วนของเอนโดคาร์ป (endocarp) โดยนำส่วนที่เป็นน้ำคั้นและกากที่เหลือมาหมักและสกัดด้วยเอทานอล สารสกัดหยาบที่ได้จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญรวมชนิดต่างๆที่สำคัญ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์และแอนโทไซยานิน ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้เป็นสารที่สนใจในการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะใช้ในการศึกษาในส่วนของการใช้ที่มีต่อความจำ การลดภาวะเครียดที่เกิดขึ้น

1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

ส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ทองดี และ ขาวน้ำผึ้ง ที่ใช้ในการทดลองนั้นจะเป็นผลสุกพร้อมรับประทาน โดยแหล่งที่มาของพันธุ์ทับทิมสยามได้มาจากจังหวัดนครศรีธรรมราช ส่วนพันธุ์ทองดี และขาวน้ำผึ้งได้มาจากจังหวัดชัยภูมิ ตัวอย่างที่เก็บได้นำมาทำการแยกส่วนของเปลือก เยื่อติดเปลือก เยื่อติดเนื้อและเมล็ดออก แล้วนำไปคั้นน้ำแล้วส่วนของน้ำจะนำไปทำให้แห้งโดยการ freeze drying ส่วนของกากที่เหลือนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำไปบดเป็นผงละเอียด จากนั้นนำทั้งสองส่วนไปหมักด้วย 95 % เอทานอล (อัตราส่วน 1 กรัม/เอทานอล 4 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 7 วัน ส่วนสกัดที่ได้นำไปกรองและทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator

1.2 การควบคุมคุณภาพของสารสกัดโดยวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญรวมของฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ และ แอนโทไซยานิน

1.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ดัดแปลงมาจากการศึกษาของ Woisky และ Salatino ในปี 1998 โดยสกัดฟลาโวนอยด์จากตัวอย่างโดยใช้เอทานอล จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนของสารละลายใส แล้วสกัดตะกอนที่เหลือซ้ำโดยใช้เอทานอล นำสารละลายที่สกัดได้ 0.5 มิลลิลิตรใส่ในขวดปรับปริมาตรสีชาขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการเตรียมสารละลายมาตรฐานของเคอซีตินที่ความเข้มข้น 10 – 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

1.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (Total carotenoids) โดยวิธี UV Spectrophotometry

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Davies (1976) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน β -carotene และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยการเตรียมกราฟมาตรฐาน (Standard curve) จากการเตรียม Stock standard solution ทำได้โดยใช้สารมาตรฐาน β -carotene (Sigma-Aldrich®) 5 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 10 มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารละลายส่วนนี้ไปเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 10 – 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm สำหรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจะละลายสารสกัดที่ได้ด้วยเมทานอล กรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกัน นำค่าที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมขึ้นมา

1.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมจะทำตามวิธีของ Waterhouse (2002) โดย เตรียมสารสกัดตัวอย่างในส่วนของน้ำแล้วนำมาเติม Folin-Ciocalteu reagent ที่นำมาเจือจางด้วยน้ำ 10 เท่า ผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-100 ppm โดย นำไปเติมสารต่างๆตามขั้นตอนเดียวกับสารตัวอย่าง

1.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม

เตรียมสารสกัดในส่วนของน้ำและเอทานอลจากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential method ตามวิธีของ Lee *et al* (2005) โดยคำนวณเทียบกับ cyaniding-3-glucoside equivalence, mg/L โดยคำนวณจากสมการดังต่อไปนี้ คือ

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/L)} = A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3 / (\epsilon \times L)$$

โดย A = ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และ 700 nm ที่ pH 1 และ 4.5

$$(A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$$

$$\text{MW} = 499.2 \text{ g/mol (cyanidine-3-glucoside)}$$

$$\text{DF} = \text{dilution factor}$$

$$\epsilon = \text{molar extinction coefficient } 26,900 \text{ (L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}) \text{ (cyanidine-3-glucoside)}$$

$$L = \text{ความกว้างของคิวเวท (cm)}$$

โดยมีอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้คือ pH meter และ UV-Visible spectrophotometer สำหรับการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 1 นั้น เตรียมได้จากการชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 1.86 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่น 980 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 1 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ประมาณ 6.3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 L ส่วนการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 4 นั้น เตรียมได้จากการชั่งโซเดียมอะซิเตท ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 54.43 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ประมาณ 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 L สารละลายบัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน โดย สัดส่วนของสารละลายสกัดที่ใช้ประมาณ 10 มิลลิลิตร ต่อ สารละลายบัฟเฟอร์ 40 มิลลิลิตร โดย เตรียมสารละลายในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

ผลการศึกษา

1. ผลการเตรียมสารสกัดหยาบ

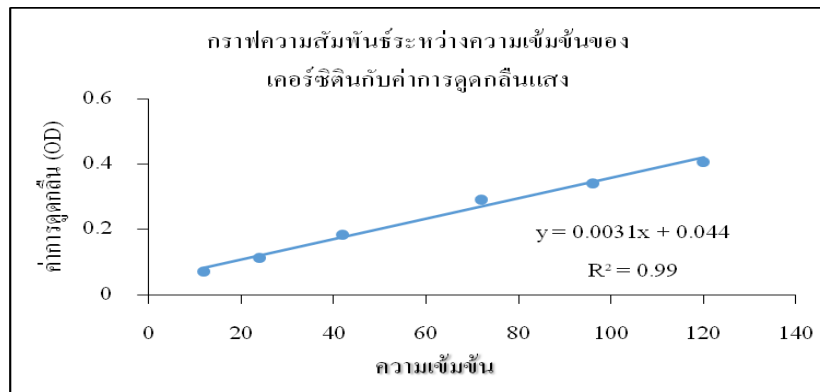
จากการสกัดตัวอย่างเนื้อผลส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ทองดี และ ขาวน้ำผึ้ง ได้ร้อยละของปริมาณสารสกัด (%yield) จากการสกัดด้วย 95% เอทานอลและทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator พบร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้เทียบกับน้ำหนักสด เท่ากับ 0.058 % (ทับทิมสยาม) 0.101 % (ทองดี) และ 0.052 % (ขาวน้ำผึ้ง) และพบร้อยละของปริมาณสารสกัดที่ได้เทียบกับน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 1.245 % (ทับทิมสยาม) 1.452 % (ทองดี) และ 3.232% (ขาวน้ำผึ้ง)

2. ผลการควบคุมคุณภาพของสารสกัดโดยวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญรวมของฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แครโทีนอยด์ และ แอนโทไซยานิน

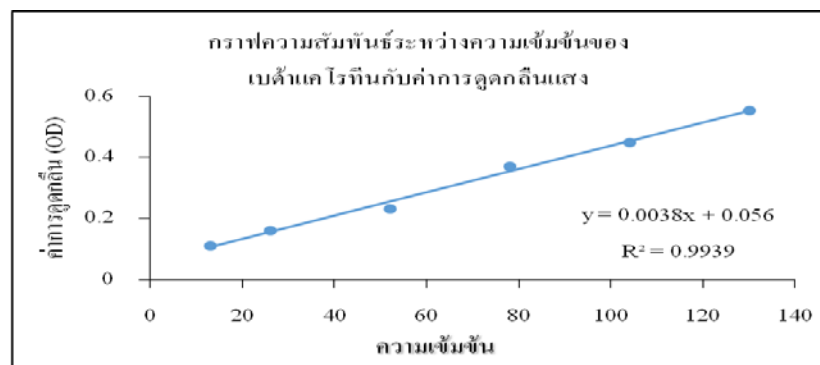
จากการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารสำคัญในสารสกัดของผลส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ทองดี และ ขาวน้ำผึ้ง ที่เตรียมจากขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบ พบปริมาณสารสำคัญรวมชนิดต่างๆดังแสดงในตารางที่ 1 และจากการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์จะเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเคอซีตินที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 1 สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์รวมจะวิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐานเบต้า-แคโรทีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกนั้นจะวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ดังแสดงในรูปที่ 3 ส่วนปริมาณรวมของแอนโทไซยานินนั้นจะวิเคราะห์เทียบเท่ากับปริมาณของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ แต่อย่างไรก็ตามโดยสรุปจากผลการทดลองปริมาณรวมของสารสำคัญหมด พบว่า ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม มีปริมาณฟลาโวนอยด์, ปริมาณแคโรทีนอยด์, ปริมาณฟีนอลิกรวม และ ปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุด รองลงมาคือ พันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้งตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารสำคัญรวมที่ได้จากการศึกษาเป็นข้อมูลที่สำคัญที่นำไปสู่การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติมในสัตว์ทดลองและในเซลล์เพาะเลี้ยงในงานวิจัยครั้งนี้

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ และ แคโรทีนอยด์ ที่พบในสารสกัดเอทานอลของผลส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ทองดี และ ขาวน้ำผึ้ง

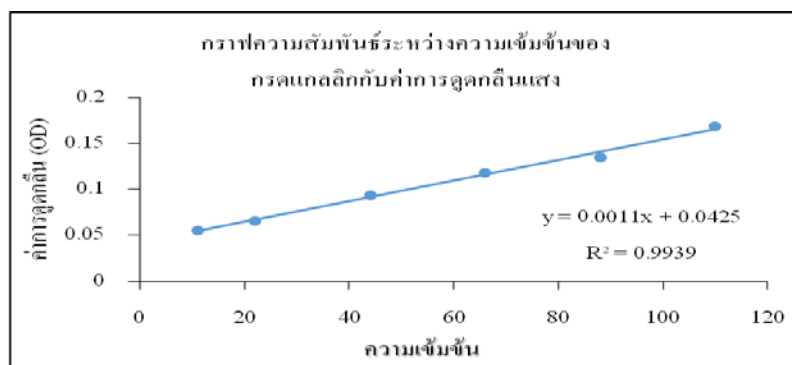
ปริมาณสารสำคัญในสารสกัด	สารสกัดเอทานอลของผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (n=5)	สารสกัดเอทานอลของผลส้มโอพันธุ์ทองดี(n=5)	สารสกัดเอทานอลของผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง(n=5)
ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mg/g extract)	9.24 (±0.15)	6.74 (±0.06)	3.88 (±0.05)
ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (mg/g extract)	113.3 (±8.30)	71.35 (±1.01)	46.60 (±0.95)
ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg/g extract)	12.72(±0.19)	10.16(±0.44)	9.04(±0.49)
ปริมาณแอนโทไซยานินรวม (mg/g extract)	1.10(±0.02)	0.96(±0.03)	0.60(±0.02)



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐาน
เคอซีตินที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐาน
เบต้า-แคโรทีนที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐาน
กรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากผลการศึกษาในส่วนนี้ พบว่าในส่วนสารสกัดจากเนื้อส่วนเอนโดคาร์ปของผลส้มโอนั้นพบปริมาณ
สารสำคัญรวมชนิดต่างๆ โดยสายพันธุ์ที่พบมากได้แก่ ทับทิมสยาม ทองดี และ ขาวน้ำผึ้ง เรียงตามลำดับทั้ง

ปริมาณฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ และแอนโทไซยานิน โดยปริมาณสารสำคัญที่พบมีผลสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัด

2. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอ 3 พันธุ์ในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อม

วิธีการศึกษา

2.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยวิธี modified Ellman's spectrophotometric method

ทดสอบดูความสามารถของสารสกัดจากผลส้มโอ 3 พันธุ์คือ พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ทองดี และ ทับทิมสยาม ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยวิธี modified Ellman's spectrophotometric method โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ well plate ชนิด 96 หลุม เติมน้ำกลั่นด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์หรือสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วเติม 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมซับสเตรต คือ อะเซทิลโคลีนไอโอไดด์ (acetylcholine iodide) 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 405 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

2.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

ในการทดลองนี้ใช้อนุมูล 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) เป็น substrate เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลส้มโอ DPPH[•] เป็นอนุมูลอิสระในโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 nm ความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระจะถูกประเมินโดยทำการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ DPPH[•] ได้เป็น DPPH ซึ่งมีสีเหลือง แล้วทำการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้เครื่องสเปกโตรมิเตอร์วัดการลดลงของสี

2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี ABTS assay

วิธีนี้เป็นวิธีวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทางอ้อมโดยการเปลี่ยนสาร 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS ให้อยู่ในรูปอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} โดยการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K₂S₂O₈) ทำโดยละลาย ABTS 0.0036 กรัม และ K₂S₂O₈ 0.00067 กรัม ในน้ำ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS^{•+} ที่ได้ด้วย Ethanol จนได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรเป็น 0.7 ± 0.02 (ABTS^{•+} stock solution) หลังจากนั้นผสมสารสกัดจากผลส้มโอ ที่ความเข้มข้นต่างๆ 50 μ L และ ABTS^{•+} stock solution 150 μ L เข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm

2.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาท Neuroblastoma

เพาะเลี้ยง human neuroblastoma cell (SH-SY5Y) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Ham's F12 : Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ในอัตราส่วน 1 : 1 ซึ่งประกอบด้วย 10% fetal bovine serum และ 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 2 วัน

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

2.5 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลสัมฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องมาจาก hydrogen peroxide โดยวิธี cell based assay

เพาะเลี้ยง human neuroblastoma cell (SH-SY5Y) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Ham's F12 : Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ในอัตราส่วน 1 : 1 ซึ่งประกอบด้วย 10% fetal bovine serum และ 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 2 วัน

ทดสอบหาความเข้มข้นของ hydrogen peroxide

ทดสอบหาความเข้มข้นของ hydrogen peroxide ที่สามารถทำลายเซลล์ได้ประมาณ 50% โดยนำ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 5 ความเข้มข้น (100 – 1,000 µM) มาบ่มกับเซลล์ที่ได้ในถาดเพาะเลี้ยง 96 หลุม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทดสอบหาความเข้มข้นของ hydrogen peroxide ที่สามารถทำลายเซลล์ได้ประมาณ 50% โดยตรวจวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ด้วยวิธี MTT assay

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress

ทดสอบความสามารถในการป้องกันการทำลายเซลล์ โดยนำสารที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1 – 100 µg/mL) มาบ่มกับเซลล์ที่ได้ในถาดเพาะเลี้ยง 96 หลุม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย buffer ต่อจากนั้น เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย 250 µM hydrogen peroxide 2 ชั่วโมง ทดสอบความสามารถในการป้องกันการทำลายเซลล์โดยตรวจวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ด้วยวิธี MTT assay

2.6 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลสัมฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย 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

ทดสอบหาความเข้มข้นของ beta amyloid

ทดสอบหาความเข้มข้นของ beta amyloid 1-42 ที่สามารถทำลายเซลล์ได้ประมาณ 50% โดยนำ beta amyloid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ความเข้มข้น (10, 25, 50 μM) มาบ่มกับเซลล์ที่ได้ในภาวะเพาะเลี้ยง 96 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบหาความเข้มข้นของ beta amyloid 1-42 ที่สามารถทำลายเซลล์ได้ประมาณ 50% โดยตรวจวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ด้วยวิธี MTT assay

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่เหนี่ยวนำโดย beta amyloid 1-42

ทดสอบโดยนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ด้านการทำลายเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid 1-42 โดยวิธี MTT colorimetric assay ทำการ aggregate beta amyloid 1-42 ก่อนโดยนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น (0.1 – 100 $\mu\text{g/ml}$) และ aggregated beta amyloid 1-42 มาบ่มกับเซลล์ในภาวะเพาะเลี้ยง 96 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบความสามารถในการป้องกันการทำลายเซลล์โดยตรวจวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ด้วยวิธี MTT assay

2.7 การศึกษาผลของสารสกัดส้มโอที่มีฤทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide โดยวิธี Western blotting analysis

จากผลการทดสอบฤทธิ์ปกป้องการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยภาวะ oxidative stress โดยใช้ hydrogen peroxide และจากการเหนี่ยวนำโดยพิษของ beta-amyloid ของสารสกัดจากผลส้มโอ 3 พันธุ์คือ พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ทองดี และ ทับทิมสยาม พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ปกป้องการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยภาวะ oxidative stress แต่ไม่มีผลปกป้องการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย beta-amyloid ดังนั้นจึงทำการศึกษาต่อถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยภาวะ oxidative stress โดยการวัดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ประสาทวิธี Western blotting และ immunoblotting analysis

การศึกษาผลของสารสกัดส้มโอที่มีฤทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide

การตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ประสาทโดยวิธี Western blotting และ immunoblotting analysis โดยนำสารสกัดที่มีความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มาบ่มกับเซลล์ human neuroblastoma cell (SH-SY5Y) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย buffer ต่อจากนั้นบ่มเซลล์ต่อด้วย hydrogen peroxide 250 μM เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาแยกสกัดโปรตีน โดยนำ lysate ที่ได้มาแยกวิเคราะห์ (electrophoresis) บน polyacrylamide gel (10% SDS-PAGE) และ transfer โปรตีนจากเจลลงสู่แผ่น nitrocellulose membrane แบบ semi-dry เพื่อนำมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีปฐมภูมิที่จำเพาะต่อโปรตีน แล้วตรวจสอบการจับของแอนติบอดีปฐมภูมิ ด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) หลังชะล้าง membrane จนสะอาด เติม substrate ECL (enhanced chemiluminescence's kit) แล้วประกบลงบนแผ่นฟิล์ม ในเวลาที่พอเหมาะ ทำการล้างฟิล์มและตรวจวัดเปรียบเทียบกับความเข้มของแถบโปรตีน

2.8 การศึกษาผลของสารสกัดส้มโอที่มีฤทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย beta-amyloid

การตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ประสาทโดยวิธี Western blotting และ immunoblotting analysis โดยนำสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 µg/mL มาบ่มกับเซลล์ human neuroblastoma cell (SH-SY5Y) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย buffer ต่อจากนั้นบ่มเซลล์ด้วย hydrogen peroxide 250 µM เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาแยกสกัดโปรตีนโดยนำ lysate ที่ได้มาแยกวิเคราะห์ (electrophoresis) บน polyacrylamide gel (10% SDS-PAGE) และ transfer โปรตีนจากเจลลงสู่แผ่น nitrocellulose membrane แบบ semi-dry เพื่อนำมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีปฐมภูมิที่จำเพาะต่อโปรตีน แล้วตรวจสอบการจับของแอนติบอดีปฐมภูมิ ด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) หลังชะล้าง membrane จนสะอาด เติม substrate ECL (enhanced chemiluminescence's kit) แล้วประกบบนแผ่นฟิล์ม ในเวลาที่พอเหมาะ ทำการล้างฟิล์มและตรวจวัดเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีน

2.9 การศึกษาฤทธิ์ในการเพิ่มและฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำของสารสกัดจากผลส้มโอในสัตว์ทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการป้องกันการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ Scopolamine ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิทยาศาสตร์ (AEKKU 73/2556) โดยทดสอบในหนูเม้าส์ ใช้โมเดลศึกษา water maze สำหรับวัดผล long-term memory และ Y-maze test สำหรับวัดผล short-term memory หนูเม้าส์ เพศผู้ พันธุ์ ICR อายุ 6 อาทิตย์ น้ำหนัก 30- 40 กรัม ถูกเลี้ยงเป็นเวลา 1 อาทิตย์อยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น 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 และทำการป้อนสารสกัดทางปากให้หนูในปริมาตร 0.2 – 0.4 ml ขึ้นกับน้ำหนักตัวหนู วันละ 1 ครั้งทุกวัน เป็นเวลา 1 อาทิตย์ ก่อนการทดสอบ โดยหนูแต่ละกลุ่มได้รับยา ดังนี้

- 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 mg/kg จำนวน 10 ตัว
- กลุ่ม 4 กลุ่มทดสอบที่ได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ขนาด 250 mg/kg จำนวน 10 ตัว
- กลุ่ม 5 กลุ่มทดสอบที่ได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ขนาด 500mg/kg จำนวน 10 ตัว

2.9.1 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำโดยวิธี Water maze test

เมื่อป้อนสารทดสอบหนูเป็นเวลา 1 อาทิตย์แล้ว ทดสอบความสามารถของสารสกัดต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ โดยป้อนสารสกัดทางปากให้หนู ก่อนทดสอบด้วย water maze 90 นาที ทำการทดสอบการเรียนรู้จดจำตำแหน่งของแผ่นรอง (platform) โดยให้หนูว่ายน้ำในอ่างน้ำ เพื่อหาแผ่นรอง ที่เอาไว้นัยพิกเหนือ ซึ่งวางไว้ใต้ระดับน้ำ 1 cm โดยอ่างน้ำจะถูกแบ่งเป็น 4 ส่วน หนูจะถูกปล่อยลงอ่างน้ำโดยปล่อยหนูให้หันหน้าเข้าหาอ่างและปล่อยในส่วนที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ จับเวลาที่หนูใช้ในการหาแผ่นรองในแต่ละส่วน (Escape latency time) ถ้าครบ 60 วินาทีแล้วหนูยังหาแผ่นรองไม่เจอ ให้จับหนูมาวาง

บนแผ่นรองเป็นเวลา 15 วินาที เมื่อหนูว่ายน้ำจนครบ 4 ส่วนแล้ว ให้จับหนุออกและเช็ดหนูให้แห้ง และนำหนูเข้ากรง ทำการทดสอบติดต่อกัน 6 วัน ประเมินความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ โดยการเปรียบเทียบระยะเวลาในการหาตำแหน่งแผ่นรองของกลุ่มสารทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2.9.2 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากรับ Scopolamine โดยวิธี Water maze test

เมื่อป้อนสารทดสอบหนูเป็นเวลา 1 อาทิตย์แล้ว เริ่มทำการทดลองโดยการฝึกหนูว่ายน้ำ (Training period) ในอ่างน้ำ ที่ถูกแบ่งเป็น 4 ส่วนและมีแผ่นรองอยู่ในส่วนที่ 1 หนูแต่ละตัวได้ถูกฝึกให้ว่ายน้ำทุกวัน ติดต่อกัน 6 วัน โดยในแต่ละวันปล่อยหนูให้ว่ายน้ำในอ่างน้ำในส่วนที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับเป็นเวลา 60 วินาที จับเวลาที่หนูใช้ในการหาแผ่นรองในแต่ละส่วน (Escape latency time) ฝึกจนเวลาที่ใช้ในการหาแผ่นรองคงที่ (6 วัน) หลังจากนั้นทำการทดสอบโดยการนำแผ่นรองออก จับเวลาที่หนูใช้ว่ายอยู่ใน Quadrant ที่เคยวางแผ่นรองไว้ (Time spent in Q1) โดยในวันทดสอบ ได้ป้อนสารสกัดทางปากให้หนูก่อนเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นจะฉีดสโคปอลามีน 1 mg/kg หรือ normal saline เข้าทางช่องท้อง (i.p.) ก่อนทดสอบด้วย water maze 30 นาทีโดยหนูแต่ละกลุ่มได้รับสารดังนี้

กลุ่มที่	Treatment
กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมปกติ	น้ำ 10 ml/kg + Normal Saline
กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุมที่มีภาวะความจำบกพร่อง	น้ำ 10 ml/kg + scopolamine 1 mg/kg
กลุ่มที่ 3 กลุ่มสารมาตรฐาน	Tacrine 10 mg/kg + scopolamine 1 mg/kg
กลุ่มที่ 4 กลุ่มสารทดสอบ	สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม 250 mg/kg + scopolamine 1 mg/kg
กลุ่มที่ 5 กลุ่มสารทดสอบ	สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม 500 mg/kg + scopolamine 1 mg/kg

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 สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม จะบริหารยาโดยการป้อนทางปากในปริมาตร 0.2 – 0.4 ml ขึ้นกับน้ำหนักตัวหนู วันละ 1 ครั้ง โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียม คือ น้ำ

ประเมินความสามารถในการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องโดยการเปรียบเทียบระยะเวลาในการหาตำแหน่งของแผ่นรองใน Quadrant ที่เคยวางแผ่นรองไว้ของกลุ่มสารทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำให้ความจำบกพร่องโดย scopolamine

2.8.3 ทดสอบผลของสารสกัดต่อภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการฉีด Scopolamine ในหนูเมาส์ โดยวิธี Y-maze

เมื่อป้อนสารสกัดให้หนูเป็นเวลา 1 อาทิตย์แล้ว ทดสอบผลของสารสกัดในการป้องกันการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากรับ Scopolamine โดยใช้โมเดลศึกษา Y-maze ซึ่งเป็นโมเดล สำหรับวัดผล short-term memory โดยป้อนสารสกัดทางปากให้หนูก่อนเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นจึงฉีดสโคปอลามีนขนาด 1 mg/kg เข้าทางช่องท้อง (i.p.) ก่อนทดสอบด้วย Y-maze 30 นาที โดยหนูแต่ละกลุ่มได้รับสารดังนี้

- น้ำ 10 ml/kg ร่วมกับ Normal Saline
- น้ำ 10 ml/kg ร่วมกับ scopolamine 1 mg/kg
- Tacrine 10 mg/kg (สารมาตรฐาน) ร่วมกับ scopolamine 1 mg/kg
- สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม 250 mg/kg ร่วมกับ scopolamine 1 mg/kg
- สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม 500 mg/kg ร่วมกับ scopolamine 1 mg/kg

ทดสอบโดยปล่อยหนูที่แขนด้านใดด้านหนึ่งของ Y-maze เป็นเวลา 8 นาที คูลำดับการเข้าในแต่ละแขน และนับจำนวนครั้งในการเข้าแต่ละแขนของหนูแต่ละตัว และทำการบันทึก alternation behavior (%) ของหนูเมาส์ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง โดยก่อนปล่อยหนูตัวต่อไปต้องทำความสะอาดอุปกรณ์ด้วย 70 % alcohol เพื่อกำจัดกลิ่นของหนูที่ทำการทดลองได้ทำการทดลองไปแล้ว

2.10. การทดสอบทางสถิติ

ในการศึกษาทดลองและตรวจวัดทุกขั้นตอน ใน *in vitro* test และ cell culture จะดำเนินการไม่น้อยกว่า 3 การทดลอง และกระทำถึง 3-5 ครั้งในทุกการทดลอง ข้อมูลที่ได้จึงนำเสนอในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และใช้ student's t-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล 2 กลุ่ม และถือว่ามีความสำคัญทางสถิติเมื่อ $p < 0.05$ ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต่างๆ ของสารสกัดในสัตว์ทดลอง จะใช้ ANOVA test เพื่อดูความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัด

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

2.1 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอในการยับยั้งเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรสโดยวิธี modified Ellman's spectrophotometric method

การนำสารสกัดผลส้มโอทั้งหมด 3 พันธุ์คือ พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ทองดี และ ทับทิมสยาม มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรส โดยวิธี Ellman's method เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรสโดยวัดจากปริมาณ 5-thio-2-nitrobenzoate ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของ acetylthiocholine iodide (ATCI) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น โดยมีเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรสเข้าทำปฏิกิริยา เกิดเป็น thiocholine และ acetate เมื่อเติมสารละลาย DTNB เข้าไป จะเกิดการจับกับ thiocholine เกิดเป็น 5-thio-2-nitrobenzoate ซึ่งมีสีเหลือง ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรส ได้ใช้ tacrine ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรส มาเป็นสาร positive control ผลของสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 พันธุ์ และสารมาตรฐาน tacrine ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรสได้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดส้มโอ และสารมาตรฐาน tacrine ต่อการยับยั้งเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเตอเรส

สารทดสอบ	IC ₅₀
Tacrine	0.36 $\pm$ 0.22 μ M
สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	> 500 μ g/mL
สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทองดี	> 500 μ g/mL

สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม	> 500 $\mu\text{g/mL}$
-----------------------------------	------------------------

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 พันธุ์คือ พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ทองดี และ ทับทิมสยาม ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส ในขณะที่ tacrine มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส ด้วยค่า $\text{IC}_{50} = 0.36 \mu\text{M}$

2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

สารสกัดผลส้มโอทั้งหมด 3 พันธุ์คือ พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ทองดี และ ทับทิมสยาม รวมทั้ง trolox (positive control) ได้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay การทดสอบโดยวิธีนี้ได้ใช้อนุมูลอิสระ DPPH เป็น substrate เนื่องจาก DPPH มีอิเล็กตรอนเดี่ยว มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวสูง และสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 512 nm ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดได้ถูกประเมินโดยวัดความสามารถในการลดปริมาณอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งผลการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระจะแสดงเป็น IC_{50} ซึ่งถูกแสดงไว้ในตารางที่ 3

จากการทดลองพบว่า สารสกัดผลส้มโอทั้งหมด 3 พันธุ์คือ พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ทองดี และ ทับทิมสยาม มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในระดับอ่อนถึงปานกลาง โดยส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้แรงสุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 440.5 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้น้อยกว่า ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 930.53 และ 948.02 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

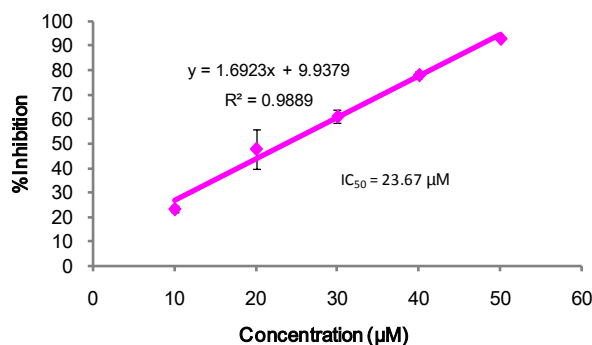
ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอ และสารมาตรฐาน trolox ต่อการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

สารทดสอบ	IC_{50}
Trolox	$35.0 \pm 3.4 \mu\text{M}$
สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	$948.0 \pm 5.3 \mu\text{g/mL}$
สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทองดี	$930.5 \pm 7.2 \mu\text{g/mL}$
สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม	$440.5 \pm 4.3 \mu\text{g/mL}$

2.3 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี ABTS assay

สารสกัดทั้งหมด 3 กลุ่มคือ สารสกัดผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง, ทองดี และทับทิมสยาม รวมทั้ง trolox (positive control) ได้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay การทดสอบโดยวิธีนี้ได้ใช้อนุมูลอิสระ $\text{ABTS}^{+\cdot}$ เป็นซับสเตรตซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยนำ ABTS มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น อนุมูล $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ที่สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดได้ถูกประเมินโดยวัดความสามารถในการ reduce อนุมูลอิสระ $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ซึ่งผลการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระจะแสดงเป็น %

inhibition ซึ่งจากการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน trolox พบว่าความเข้มข้นของ trolox ที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50 % (IC_{50}) เท่ากับ 23.67 μM ดังแสดงในรูปที่ 4



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

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง, ทองดี และทับทิมสยาม โดยใช้ trolox ที่ความเข้มข้น 25 μM เป็น positive control พบว่าทั้งสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ทับทิมสยามสามารถต้านฤทธิ์ออกซิเดชันได้ ดังแสดงในตารางที่ 4

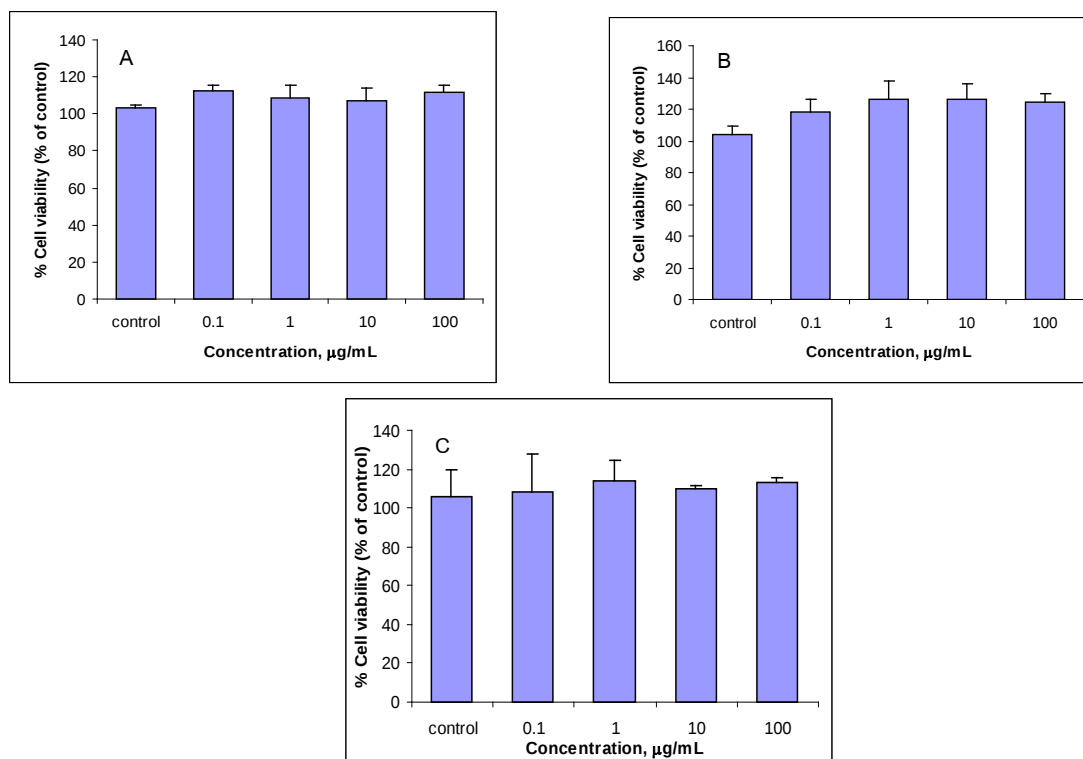
ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอ และสารมาตรฐาน trolox ต่อการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS⁺

สารทดสอบ	IC_{50}
Trolox	$23.7 \pm 0.8 \mu M$
สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	$402.2 \pm 5.4 \mu g/mL$
สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทองดี	$143.7 \pm 3.9 \mu g/mL$
สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม	$53.1 \pm 2.7 \mu g/mL$

จากการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พันธุ์ทองดี และทับทิมสยาม พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์แรงที่สุดด้วยค่า $IC_{50} = 53.1 \mu g/mL$ ในขณะที่สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้งออกฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยค่า $IC_{50} = 143.7 \mu g/mL$ และ $402.2 \mu g/mL$ ตามลำดับ

2.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาท Neuroblastoma

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาท Neuroblastoma (SH-SY5Y) โดยนำสารสกัดทั้ง 3 กลุ่ม คือ สารสกัดผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง, ทองดี และทับทิมสยาม ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0 – 100 $\mu g/mL$) มาบ่มกับเซลล์ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด ด้วยวิธี MTT assay ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดผลส้มโอ พบว่าสารสกัดผลส้มโอทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 100 $\mu g/mL$ ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ประสาท แสดงดังรูปที่ 5

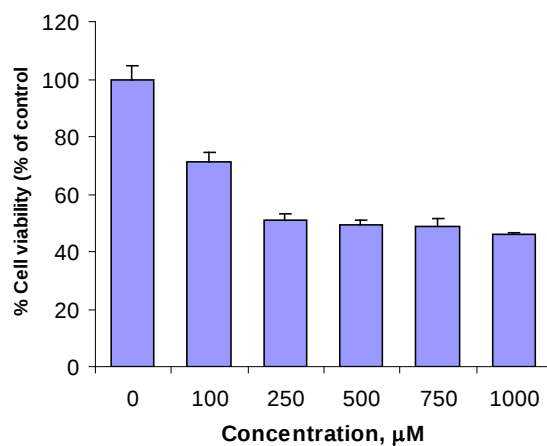


รูปที่ 5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง (A), สารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทองดี (B) และสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (C) แสดงข้อมูลด้วยค่า mean±SD (n = 4)

2.5 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องมาจาก hydrogen peroxide โดยวิธี cell based assay

ผลของการทดสอบหาความเข้มข้นของ hydrogen peroxide

เมื่อบ่มเซลล์ประสาท human neuroblastoma cell (SH-SY5Y) ด้วย hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100, 250, 500, 750 และ 1,000 μM สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ โดยมี % Cell Viability เท่ากับ 71.4 %, 50.9 %, 49.3%, 48.6% และ 46.1% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control (รูปที่ 6) ดังนั้นจึงเลือก hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 250 μM เพื่อใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ในการทดลองต่อไป

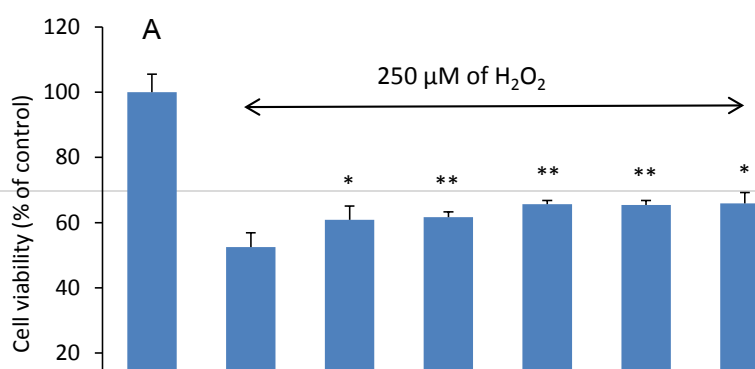


รูปที่ 6 ผลของ hydrogen peroxide ต่อการตายของเซลล์ SH-SY5Y แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n =5)

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress

สารสกัดทั้งหมด 3 กลุ่มคือ สารสกัดผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง, ทองดี และทับทิมสยาม ได้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องจาก hydrogen peroxide โดยวิธี MTT assay หลังจากบ่มเซลล์ประสาท SH-SY5Y ด้วยสารทดสอบ 2 ชั่วโมง เซลล์จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress โดยการบ่มกับ hydrogen peroxide 250 μM 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ของสารทดสอบโดยตรวจวัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT assay

จากการทดลอง พบว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress สารสกัดทั้งหมด 3 กลุ่ม พบว่าสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ทองดี และทับทิมสยาม มีฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย hydrogen peroxide โดยสามารถต้านการตายของเซลล์ประสาทอันเนื่องจาก hydrogen peroxide ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ เป็นต้นไป เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย hydrogen peroxide เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง (A), สารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทองดี (B) และสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (C) ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องจาก hydrogen peroxide แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n = 5), * และ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยค่า p-value < 0.05 และ 0.01 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย hydrogen peroxide เพียงอย่างเดียว

ซึ่งผลการทดลองที่ได้จาก cell culture เป็นไปในแนวทางเดียวกับผลต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง ดังนั้นฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ของสารสกัด อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant action) ของสาร

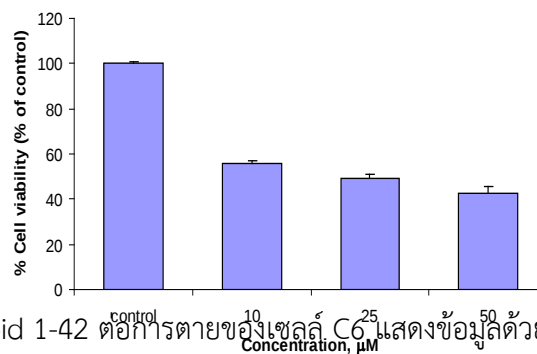
2.6 ผลทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลส้มโอในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid โดยวิธี cell based assay

การสะสมของ beta amyloid plaque ในสมองส่วน hippocampus ถือเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ ดังนั้นถ้าสารใดสามารถป้องกันการเกิดพิษต่อเซลล์ของ beta amyloid ได้ น่าจะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการช่วยชะลอการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ลงได้ ดังนั้นใน

การทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดส้มโอในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจาก beta amyloid

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ beta amyloid

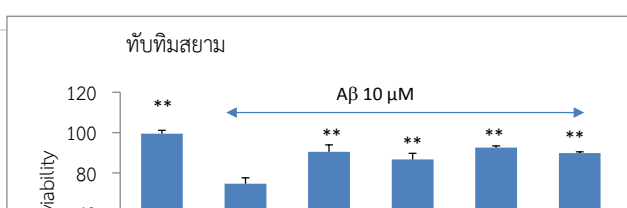
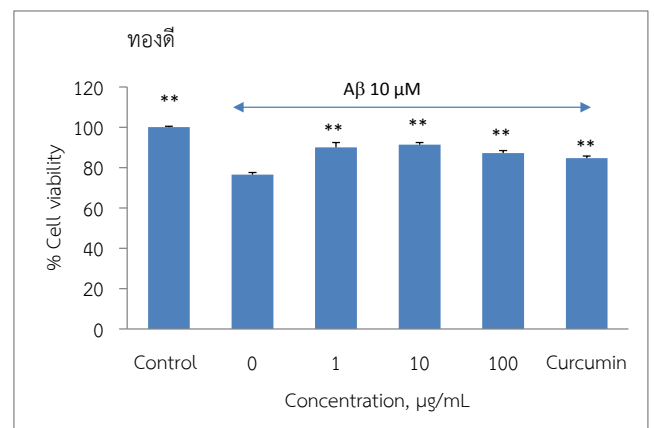
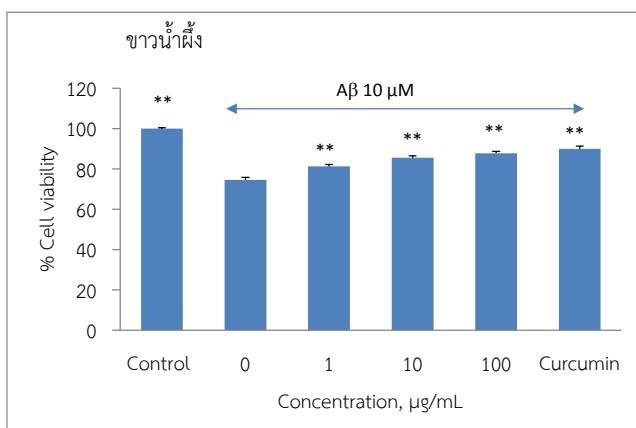
เมื่อบ่มเซลล์ C6 cell ด้วย aggregated beta amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า beta amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 μM สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ โดยมี % cell viability เท่ากับ 55.9%, 49.2% และ 42.8% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control (รูปที่ 8) ดังนั้นจึงเลือก beta amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้น 10 μM เพื่อใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 8 ผลของ beta amyloid 1-42 ต่อการตายของเซลล์ C6 แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n = 4)

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำโดย beta amyloid 1-42

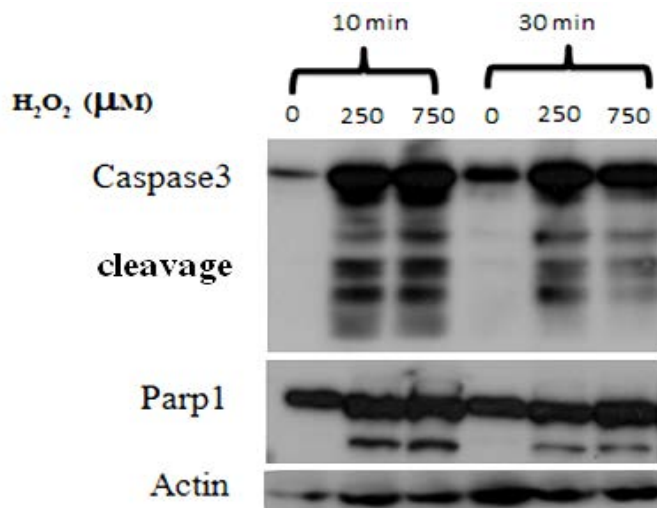
จากการทดลอง นำสารสกัดทั้งหมด 3 กลุ่ม คือสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทองดี พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และพันธุ์ทับทิมสยาม ที่ความเข้มข้น 1 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ aggregated beta amyloid 1-42 ความเข้มข้น 10 μM มาบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ curcumin 10 μM เป็น positive control พบว่า curcumin ที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย aggregated beta amyloid 1-42 เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าสารทดสอบทั้ง 3 ชนิด ทุกความเข้มข้นสามารถเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย aggregated beta amyloid 1-42 เพียงอย่างเดียว ดังแสดงดังรูปที่ 9 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลส้มโอสามารถป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid toxicity ได้



รูปที่ 9 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง (A), สารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทองดี (B) และสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (C) ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากพิษของ beta amyloid 1-42 แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n = 4), * และ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยค่า p-value < 0.05 และ 0.01 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วย beta amyloid 1-42 เพียงอย่างเดียว

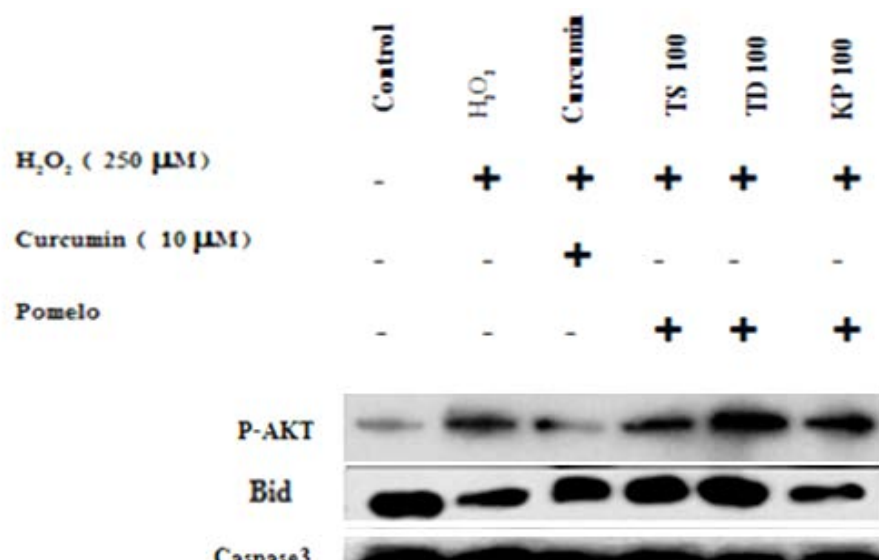
2.7 ผลการศึกษาผลของสารสกัดจากผลส้มโอต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide โดยวิธี Western blotting analysis

ผลของสารสกัดจากผลส้มโอต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide ได้ถูกทดสอบโดยวิธี Western blotting analysis การทดลองเริ่มจากการหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของ hydrogen peroxide ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการ cleave ของ caspase-3 และ PARP-1 ซึ่งเป็นสัญลักษณ์ที่สำคัญของกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เมื่อบ่มเซลล์ด้วย hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 250, 750 μ M ที่เวลา 10 และ 30 นาที พบว่า hydrogen peroxide มีผลเหนี่ยวนำให้เกิด cleavage ของโปรตีน PARP-1 และ Caspase-3 ซึ่งเป็น protein markers ที่สำคัญของ กระบวนการ apoptosis ดังแสดงในรูปที่ 10 จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า hydrogen peroxide มีผลกระตุ้นการตายของเซลล์ผ่านกระบวนการ apoptosis โดยความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำให้เกิด cleavage อย่างชัดเจนคือ ความเข้มข้น 250 และ 750 μ M ที่เวลา 10 นาที ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้ความเข้มข้น 250 μ M ที่เวลา 10 นาที ในการเหนี่ยวนำเซลล์ประสาทให้เกิดการตายแบบ apoptosis เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิด cleavage อย่างชัดเจน



รูปที่ 10 ผลของ Hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อบ่มกับเซลล์เป็นเวลา 10 และ 30 นาทีต่อการแสดงออกของโปรตีน PARP-1 ที่ถูกตัด (cleaved PARP-1) และ caspase-3 ที่ถูกตัด (cleaved caspase-3)

ผลจาก Western blot แสดงให้เห็นว่า เมื่อบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 พันธุ์ คือส้มโอ พันธุ์ทองดี พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และพันธุ์ทับทิมสยาม ความเข้มข้น 100 μg/ml ร่วมกับ hydrogen peroxide ความเข้มข้น 250 μM พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 พันธุ์ สามารถลดการแสดงออกของ caspase-3 ที่ถูกตัด (cleaved caspase-3) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่บ่มด้วย hydrogen peroxide เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 11) นอกจากนี้ยังพบว่า hydrogen peroxide เหนี่ยวนำให้เกิดการเติมฟอสเฟตของโปรตีน Akt ซึ่งเป็นโปรตีนในวิถี hydrogen peroxide induced apoptosis และกระตุ้นโปรตีน Bid (แสดงจากการหายไปของโปรตีน Bid ซึ่งจะกลายเป็น tBid ซึ่งจะส่งผลให้เกิด apoptosis ต่อไป) ผลของสารสกัดจากผลส้มโอ 3 สามพันธุ์ คือพันธุ์ทับทิมสยาม พันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พบว่าส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามสามารถป้องกันการเติมฟอสเฟตให้กับโปรตีน Akt และ ลดการกระตุ้นโปรตีน Bid ได้ สำหรับส้มโอพันธุ์ทองดีพบว่าสามารถลดการกระตุ้นโปรตีน Bid ได้ และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ไม่มีผลต่อโปรตีนทั้งสอง แต่การลดการเกิด cleavage ของ caspase-3 อาจเกิดจากโปรตีนอื่น ในวิถี apoptosis ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 11



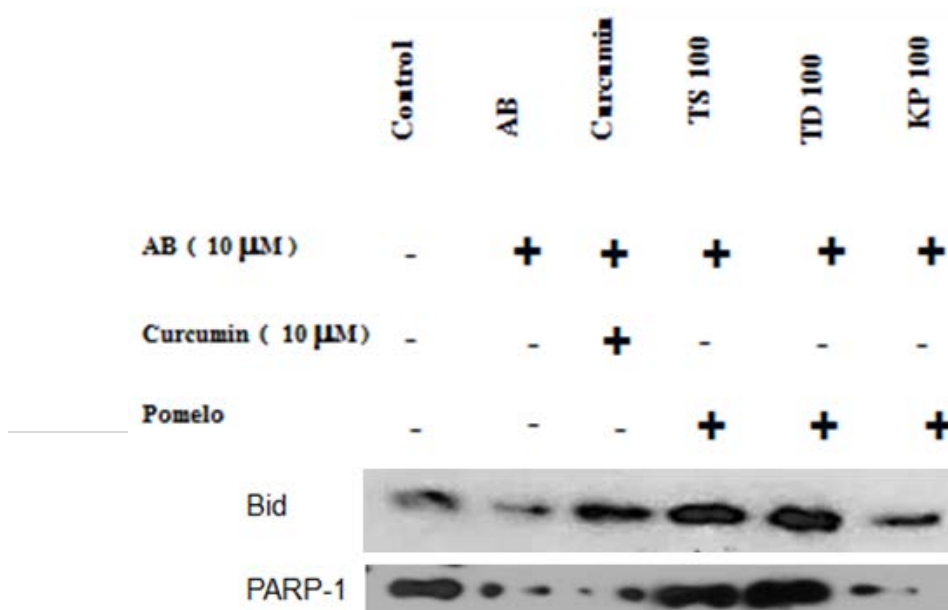
รูปที่ 11 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (TS), พันธุ์ทองดี (TD) และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง (KP) ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ SHSY-5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย hydrogen peroxide

2.8. ผลการศึกษาผลของสารสกัดจากผลส้มโอต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid โดยวิธี western blotting analysis

ผลของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทองดี พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และพันธุ์ทับทิมสยาม ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid 1-42 ได้ถูกทดสอบโดยวิธี western blotting analysis โดยใช้ curcumin เป็น positive control

เมื่อบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดจากส้มโอ 3 สายพันธุ์ คือพันธุ์ทับทิมสยาม พันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ความเข้มข้น 100 μM ร่วมกับ aggregated beta amyloid 1-42 ที่ความเข้มข้น 10 μM พบว่า aggregated beta amyloid 1-42 เพียงอย่างเดียวเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดโปรตีน PARP-1 (รูปที่ 12) ซึ่งเป็น DNA repair proteins (สังเกตจากการลดลงของโปรตีน PARP-1) นอกจากนี้ยังกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Bid ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ และสารสกัดจากส้มโอ 2 สายพันธุ์ คือพันธุ์ทับทิมสยาม และพันธุ์ทองดี มีผลลดการกระตุ้นของโปรตีน Bid และ การสลายของ PARP-1 ทำให้ป้องกันการตายของประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid 1-42 ได้ สำหรับพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ไม่มีผลต่อโปรตีนทั้งสอง

ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจากส้มโอ 2 สายพันธุ์ คือพันธุ์ทับทิมสยาม และพันธุ์ทองดี สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid 1-42 ได้



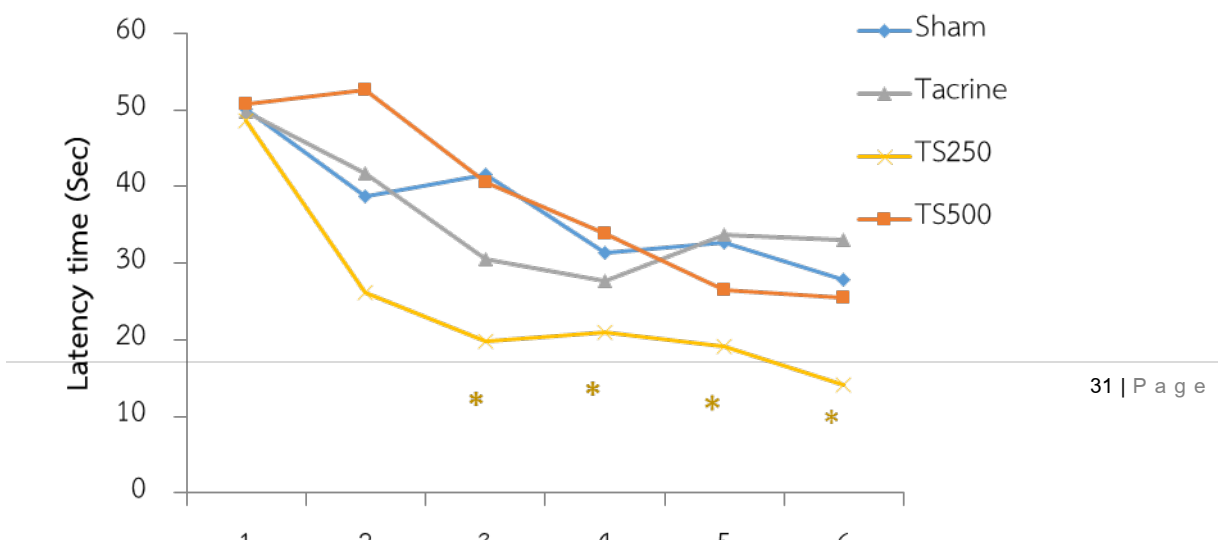
รูปที่ 12 ผลของสารสกัดจากส้มโอ 3 สามพันธุ์ คือพันธุ์ทับทิมสยาม (TS) พันธุ์ทองดี (TD) และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง (KP) ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย beta amyloid 1-42

2.9. ผลการศึกษาฤทธิ์ในการเพิ่มและฟื้นฟูการรับรู้และความจำของสารสกัดจากผลส้มโอในสัตว์ทดลอง

จากผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นโดยวิธีทางหลอดทดลอง (*In Vitro*) และในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์กำจัด free radical และมีฤทธิ์ป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และ beta amyloid ได้ดี จึงได้เลือกสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมาทำการศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันโรค Alzheimer ต่อใน model สัตว์ทดลอง โดยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการเพิ่มและฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องจากได้รับ scopolamine ในหนูทดลอง โดยใช้โมเดลศึกษาคือ Morris Water Maze สำหรับวัดผล long-term memory และ Y-maze test สำหรับวัดผล short-term memory

2.9.1 ผลของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ โดยวิธี Water maze test

ฤทธิ์ของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ ถูกทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา Morris water maze หนูที่ได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 7 วันได้ถูกนำมาทดสอบการเรียนรู้จดจำตำแหน่งโดยให้หนูว่ายน้ำในอ่างน้ำ (water maze) แล้วให้หนูฝึกหาแผ่นรอง (platform) ที่เอาไว้นักพักเหนื่อย ประเมินความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำโดยการเปรียบเทียบระยะเวลาในการหาดำแหน่งของแผ่นรอง (Escape latency) ของกลุ่มสารทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ (sham) ผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามขนาด 250 mg/kg สามารถกระตุ้นการเรียนรู้และความจำได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 3 ถึงวันที่ 6 ของการทดสอบ (รูปที่ 13) ในขณะที่ tacrine ไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ

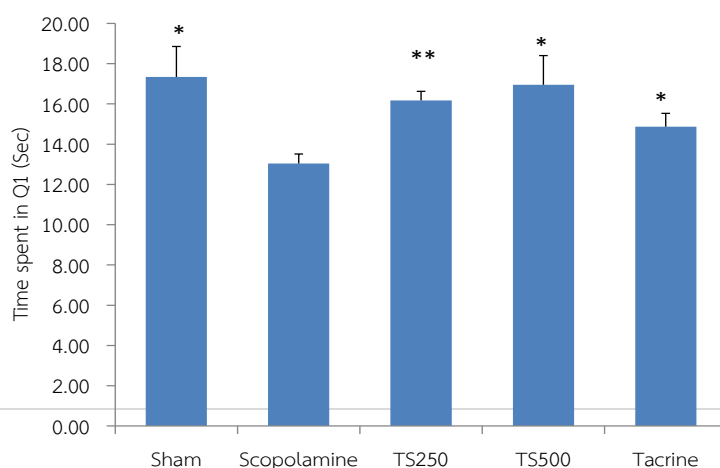


รูปที่ 13 ผลของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำ โดยวิธี water maze test แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SEM (n = 8-10) * = p-value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ

2.9.2 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาได้รับ scopolamine โดยวิธี water maze test

ฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในการฟื้นฟูภาวะความจำและการเรียนรู้ที่บกพร่องในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย scopolamine ถูกทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา Morris water maze ซึ่งเป็นโมเดลสำหรับวัดผล long-term memory หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะการเรียนรู้และความจำบกพร่องโดย scopolamine และได้รับสารทดสอบ ได้ถูกนำมาทดสอบการเรียนรู้จดจำตำแหน่งโดยให้หนูว่ายน้ำในอ่างน้ำ (water maze) แล้วให้หนูฝึกหาแผ่นรอง (platform) ที่เอาไว้น้ำลึกเหนือ ประเมินความสามารถในการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องโดยการเปรียบเทียบระยะเวลาในการหาตำแหน่งของแผ่นรองใน Quadrant ที่เคียวางแผ่นรองไว้ของกลุ่มสารทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำให้ความจำบกพร่องโดย scopolamine

วิธีการทดลองนั้นใช้หนู ICR mice เพศผู้ที่ได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 7 วัน มาฝึกให้เรียนรู้ที่จะว่ายน้ำไปยังแท่นยืนที่อยู่ใต้น้ำได้ โดยหนูถูกฝึกวันละ 4 รอบ จนกระทั่งเวลาที่ใช้ในการหาแท่นยืนคงที่ เป็นเวลา 6 วัน หลังจากนั้นทำทดสอบโดยการนำแผ่นรองออก จับเวลาที่หนูใช้ว่ายอยู่ใน Quadrant ที่เคียวางแผ่นรองไว้ (Time spent in Q1) โดยในวันทดสอบ ได้ป้อนสารสกัดทางปากให้หนูก่อนเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นจะฉีดสโคปอลามีน 1 mg/kg หรือ normal saline เข้าทางช่องท้อง (i.p.) ก่อนทดสอบด้วย water maze 30 นาที ในการทดลองนี้ได้มีการใช้ tacrine เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับ scopolamine เพียงอย่างเดียวใช้เวลาในการว่ายวนอยู่ใน Quadrant ที่เคียวางแผ่นรองน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (รูปที่ 14) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า scopolamine สามารถเหนี่ยวนำให้หนูมีภาวะความจำบกพร่องได้ เมื่อให้ tacrine ซึ่งเป็นสารมาตรฐานออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในขนาด 10 mg/kg ร่วมกับ scopolamine แก่หนูทดลอง พบว่าหนูใช้เวลาว่ายวนอยู่ใน Quadrant ที่เคียวางแผ่นรองนานกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่เกิดภาวะความจำเสื่อม (p < 0.05) ดังรูปที่ 14

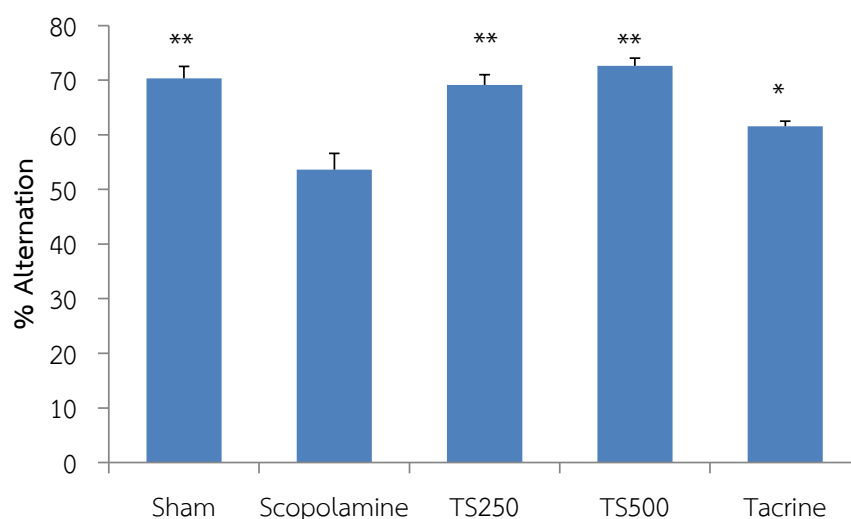


รูปที่ 14 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (TS) และ tacrine ต่อการฟื้นฟูเรียนรู้และความจำในการทดสอบ Morris water maze แสดงข้อมูลด้วยค่า mean $\pm$ SEM (n = 8-10). * และ ** = p-value < 0.05 และ <0.01 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีภาวะความจำบกพร่อง (กลุ่ม scopolamine)

สำหรับหนูที่ได้รับสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในขนาด 250 และ 500 mg/kg สามารถใช้เวลาในการว่ายน้ำอยู่ใน Quadrant ที่เคยวางแผ่นรอง ในการทดสอบ Morris water maze ได้นานกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่เกิดภาวะความจำเสื่อม (กลุ่ม scopolamine)

2.9.3 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาได้รับ scopolamine โดยวิธี Y-maze test

ฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในการฟื้นฟูภาวะความจำและการเรียนรู้ที่บกพร่องในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย scopolamine ถูกทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา Y-maze test ซึ่งเป็นโมเดลสำหรับวัดผล short-term memory จากผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับ scopolamine เพียงอย่างเดียวแสดงความถูกต้องของลำดับการเข้าในแต่ละแขน (percentage of alternation) ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมปกติ (% alternation ของกลุ่มควบคุมปกติ (sham) และกลุ่มที่ได้รับ scopolamine คือ 70.34% และ 53.63% ตามลำดับ) เมื่อให้สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในขนาด 250 และ 500 mg/kg แก่หนูติดต่อกัน 7 วัน ก่อนเหนี่ยวนำให้หนูมีภาวะการเรียนรู้และความจำบกพร่องโดย scopolamine พบว่าทั้งสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในขนาด 250 และ 500 mg/kg สามารถเพิ่ม % alternation ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่เกิดภาวะความจำเสื่อม โดยให้ค่า % alternation เท่ากับ 69.14 และ 72.61 ตามลำดับ ดังรูปที่ 15 จากผลการทดลองแสดงสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามสามารถป้องกันภาวะความจำชนิด short-term memory เสื่อมเนื่องจาก scopolamine ได้



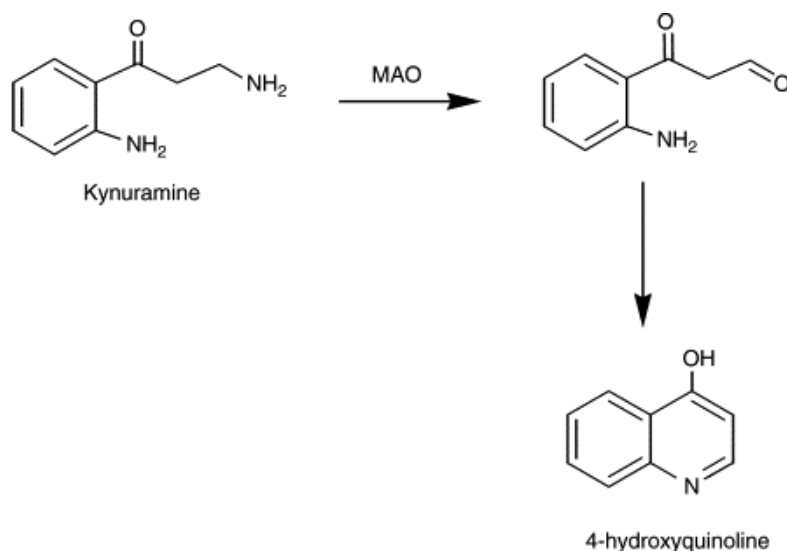
รูปที่ 15 ผลของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (TS) ต่อการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำในการทดสอบด้วย Y-Maze test แสดงข้อมูลด้วยค่า mean + SEM (n = 10) * และ ** = p-value < 0.05 และ <0.01 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีภาวะความจำบกพร่อง (กลุ่ม scopolamine)

ดังนั้นจากผลการศึกษาในสัตว์ทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม มีผลฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ได้ โดยมีผลทั้ง spatial short-term memory (ความจำระยะสั้น) และ spatial long term memory (ความจำระยะยาว)

3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ในการต้านภาวะซึมเศร้า

3.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B โดยวิธี kynuramine deamination assay

เป็นการศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากผลส้มโอในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B โดย MAO-A และ MAO-B จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน kynuramine (non-specific substrate) ได้เป็น 4-hydroxyquinoline ซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์นี้ได้ด้วยการวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer



การศึกษาในครั้งนี้ได้มีการใช้ Recombinant human MAO-A และ MAO-B เป็นแหล่งของเอนไซม์ สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย kynuramine ทำหน้าที่เป็น substrate ของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ความเข้มข้นของ kynuramine เป็น 45 μ M และ 30 μ M สำหรับ MAO-A และ MAO-B ตามลำดับ เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-10 mg/ml) และ MAO enzymes ที่ความเข้มข้น 0.0075 mg/ml ซึ่งปฏิกิริยาจะดำเนินไปในสารละลาย potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4, ปรับให้เป็น isotonic ด้วย KCl) final volume 500 μ l stock solution ของสารสกัดส้มโอ เตรียมและละลายใน DMSO เมื่อสารสกัดถูกเติมลงไปในปฏิกิริยา จะต้องมีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 4% (v/v) ซึ่งความเข้มข้นนี้ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B เมื่อเติมสารต่างๆครบ นำ reaction mixture ไป incubated ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 400 μ l 2N NaOH และ 1000 μ l distilled water นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 16,000g เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสด้านบน (supernatant) มาวัดค่าการเรืองแสงของ 4-hydroxyquinoline ที่ λ_{ex} = 310 nm, λ_{em} = 400 nm ความเข้มข้นของ 4-hydroxyquinoline คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของ 4-hydroxyquinoline โดยการเตรียมสารละลาย 4-hydroxyquinoline ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.025-2.00 μ M) ใน potassium phosphate buffer final volume 500 μ l และมีความเข้มข้นของ DMSO เป็น 4% ก่อนนำไปวัดค่าการเรืองแสงจะต้องเติม 400 μ l

2N NaOH และ 1000 ul distilled water จากนั้นนำมาแปลงเป็นค่า rate of MAO catalysis หรือ MAO activity ซึ่งคำนวณได้จาก 4-hydroxyquinoline formed/min/mg protein of MAO-A และ MAO-B นำค่า percentage of inhibition มา plot กราฟ กับ log concentration ของสารสกัด (ประมาณ 11-12 ความเข้มข้น) จะได้ sigmoidal dose-response curve และค่า IC_{50} สามารถคำนวณได้จาก MasterPlex ReaderFit software

3.2 การทดสอบผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมซึมเศร้าในหนูปกติ โดยใช้แบบทดสอบ Tail suspension test และ forced swimming test (Screening for antidepressant activity)

การทดลองนี้ใช้หนูเม้าส์ เพศผู้ พันธุ์ ICR อายุ 6 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล การทดลองทั้งหมดได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิทยาศาสตร์ (AEKKU 73/2556)

1) ทำการเลี้ยงหนูเม้าส์ โดยหนูที่ใช้ในการทดลองนี้จะเป็นหนูเม้าส์ เพศผู้ พันธุ์ ICR อายุ 6 สัปดาห์ แบ่งกลุ่มหนูที่เลี้ยงออกเป็น 8 กลุ่มตามการได้รับการบริหารยาดังนี้

- 1.1) กลุ่มควบคุมปกติ ได้รับ vehicle จำนวน 10 ตัว
- 1.2) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม 250 mg/kg จำนวน 10 ตัว
- 1.3) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม 500 mg/kg จำนวน 10 ตัว
- 1.4) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี 250 mg/kg จำนวน 10 ตัว
- 1.5) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี 500 mg/kg จำนวน 10 ตัว
- 1.6) กลุ่มที่ได้รับ สารสกัดส้มโอพันธุ์ ขาวน้ำผึ้ง 250 mg/kg จำนวน 10 ตัว
- 1.7) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง 500 mg/kg จำนวน 10 ตัว
- 1.8) กลุ่มที่ได้รับ Imipramine ขนาด 25 mg/kg จำนวน 10 ตัว

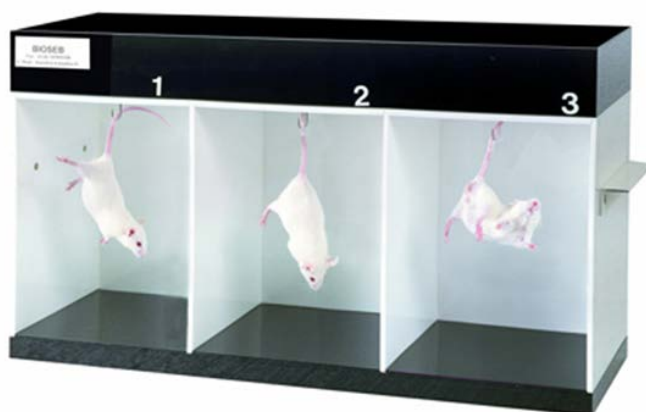
หนูเม้าส์จะได้รับ vehicle, สารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ และยา imipramine โดยการป้อนและทำการบริหารยาเพียงครั้งเดียวก่อนทำการทดสอบพฤติกรรม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

กรงที่ใช้ในการทดลอง มีขนาด 175 x 245 x 125 มิลลิเมตร ทั้งหมด 8 กรง และขวดน้ำทั้งหมด 8 ขวด โดยได้ทำการเลี้ยงหนูในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น และที่มีการควบคุมการเปิด-ปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง (12 ชม. Light-dark cycle) ให้น้ำและอาหาร เปลี่ยนวัสดุรองนอนให้หนูสัปดาห์ละ 1 ครั้ง

3.2.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอต่อค่า immobility time ในแบบทดสอบ Tail suspension test ในหนูเม้าส์ปกติ

หลังจากได้รับยาไปแล้ว 60 นาที หนูแต่ละตัวถูกนำมาทดสอบ tail suspension test ซึ่งการทดสอบนี้ จะเป็นแบบทดสอบที่นิยมใช้ในการตรวจสอบหรือคัดกรองฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้าของยา โดยภาวะเครียดที่เกิดขึ้นกับหนูเม้าส์ คือการที่หนูถูกแขวนลอยอยู่ในอากาศในท่าทางที่ผิด

ธรรมชาติ คือเอาหัวห้อยลงมา หนูจะพยายามขยับตัว เพื่อหนี หรือให้หลุดพ้นจากการอยู่ในท่าทางแบบนั้น ดังนั้นหนูที่ไม่มีการเคลื่อนไหว หรือไม่พยายามหนี สามารถแปลผลได้จากที่ immobility time ที่สูงว่าหนูตัวนั้นมีพฤติกรรมซึมเศร้า แต่ถ้าในหนูที่ได้รับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน ค่า immobility time จะมีค่าน้อยมาก และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับหนูที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว การทดสอบทำได้โดยการนำเทปกาวพันติดที่หางของหนูเมาส์ ห่างจากปลายหางประมาณ 1 ซม. จากนั้นนำหนูไปแขวนในเครื่องมือ tail suspension apparatus ดังรูป

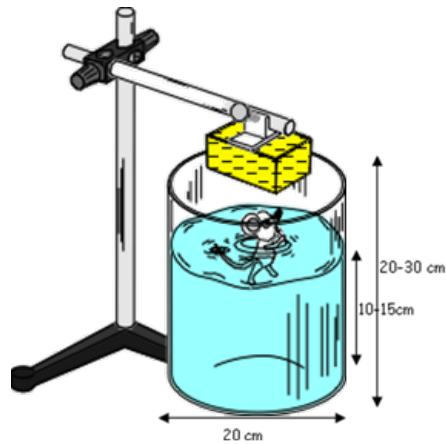


Tail suspension test apparatus

จับเวลาทั้งหมด 6 นาที บันทึกค่า Immobility time ในหนูเมาส์ แต่ละตัว บันทึกวิดีโอขณะทำการทดลองด้วยทุกครั้ง และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมช่วยบันทึกเวลา

3.2.2 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอต่อค่า immobility time ในแบบทดสอบ Forced swimming test ในหนูเมาส์ปกติ

แบบจำลอง Forced swimming test เป็นแบบจำลองที่ใช้ทดสอบภาวะซึมเศร้าในหนูเมาส์ โดยการปล่อยหนูลงว่ายน้ำในถังน้ำแคบๆที่ไม่มีทางหนี หนูที่ไม่มีความพยายามว่ายน้ำหรือตะเกียกตะกายเพื่อหนีออกจากถังน้ำ จะมีค่า Immobility time สูง แต่ถ้าหนูที่ได้รับยาต้านซึมเศร้า จะมีค่า Immobility time ต่ำกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ก่อนทำการทดสอบ forced swimming test 1 วัน จะต้องทำการฝึกหนูให้ว่ายน้ำ โดยฝึกหนูว่ายน้ำในถังแก้วทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 ซม. สูง 22 ซม. ซึ่งบรรจุน้ำสูงประมาณ 10 ซม. เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้หนูเมาส์ ได้รู้สภาวะที่ไม่มีทางหนี ดังรูป หลังการให้ยา ไปแล้ว 60 นาที จึงจะทดสอบพฤติกรรมหนู



Forced swimming test

- Forced swimming test โดยวัดเป็นเวลาที่ไม่มีการเคลื่อนไหวหลังจากที่ปล่อยลงสู่ถังน้ำ เวลาที่หนูอยู่ในถังน้ำ คือ 6 นาที แต่จะจับเวลาในช่วง 4 นาทีสุดท้าย โดยจะบันทึกภาพวิดีโอตลอดการทดลองเพื่อสังเกตพฤติกรรมหนูแต่ละตัวที่ได้รับ treatment ที่ต่างกัน

3.2.3 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอต่อ locomotor activity ในแบบทดสอบ Y maze test ในหนูเม้าส์ปกติ

Y maze test แบบจำลองนี้จะทดสอบ locomotor activity เพื่อดูผลของยาว่ามีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity หรือไม่ เป็นการกำจัด false positive ออกไป โดยที่ยาที่มีฤทธิ์ต้านซึมเศร้าจะไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity โดยปล่อยหนูลงไปที่ฐานของ maze รูปตัว Y นับจำนวนแขนที่หนูเดินใน Y Maze จับเวลา 5 นาที บันทึกผลเป็นจำนวนช่องที่หนูเดินใน Y Maze (number of arm entries)

3.3 ทดสอบผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดสะสมเป็นระยะเวลานาน ในแบบจำลองภาวะซึมเศร้าแบบ chronic mild stress

ทำการเลี้ยงหนูเม้าส์ โดยหนูที่ใช้ในการทดลองนี้จะเป็นหนูเม้าส์ เพศผู้ พันธุ์ ICR อายุ 4 สัปดาห์ แบ่งกลุ่มหนูที่เลี้ยงออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

- กลุ่มควบคุมปกติ จำนวน 12 ตัว
- กลุ่มที่ได้รับภาวะเครียดอย่างอ่อน ติดต่อกันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ จำนวน 48 ตัว

กรงที่ใช้ในการทดลอง มีขนาด 175 x 245 x 125 มิลลิเมตร ทั้งหมด 12 กรง และขวดน้ำทั้งหมด 12 ขวด โดยได้ทำการเลี้ยงหนูในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น และที่มีการควบคุมการเปิด-ปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง (12 ชม. Light-dark cycle) ให้น้ำและอาหาร เปลี่ยนวัสดุรองนอนให้หนูสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยทำการเลี้ยงติดต่อกันเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ สังเกตและจดบันทึกพฤติกรรมของหนูที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ภาวะความเครียด ความก้าวร้าว ความดุ ความตื่นตระหนก ความสนใจต่อสิ่งต่างๆ รอบตัว เป็นต้น และทำการบันทึกน้ำหนักหนู สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

3.3.1 การศึกษาผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการบริโภคซูโครสในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าด้วยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

1) Chronic mild stress (CMS) procedures และ pre-sucrose consumption test

ก่อนที่จะแบ่งหนูออกเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับความเครียด จะต้องนำหนูเมาส์ ทั้งหมดมาทดสอบการบริโภคสารละลายน้ำตาลซูโครสก่อน (sucrose consumption test) เพื่อเก็บเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับหนูแต่ละตัว การทำ sucrose consumption ทำได้โดย ให้หนูเมาส์ อดอาหารและน้ำ ก่อนที่จะทดสอบ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นให้สารละลายน้ำตาลซูโครส 2% กับหนูเมาส์ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณปริมาณซูโครสที่หนูแต่ละตัวได้รับเข้าไปในช่วงเวลาดังกล่าว ทำซ้ำอย่างนี้เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำข้อมูลที่ได้อาจแบ่งกลุ่มหนูแบบสุ่มให้มีความแปรปรวนของข้อมูลการบริโภคสารละลายซูโครส 2% น้อยที่สุดในแต่ละกลุ่ม หนูกลุ่มควบคุมจะไม่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดความเครียด ส่วนหนูกลุ่มที่เป็น CMS group จะได้รับสิ่งกระตุ้นต่างๆให้เกิดภาวะความเครียดสะสมดังแสดงในตารางต่อไปนี้

	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 —

โดยทำการกระตุ้นทั้งหมด 5 สัปดาห์

2) การให้อาหารในหนูเมาส์

หนูเมาส์ ถูกแบ่งกลุ่มการให้อาหารที่แตกต่างกันดังตาราง

กลุ่มที่	Treatment
1. หนู nonstress	vehicle
2. หนู CMS	vehicle
3. หนู CMS	สารสกัดส้มโอพันธุทับทิมสยาม 250 mg/kg/day
4. หนู CMS	สารสกัดส้มโอพันธุทับทิมสยาม 500 mg/kg/day
5. หนู CMS	Imipramine 20 mg/kg/day

หนูเม้าส์ จะเริ่มได้รับยาตั้งแต่วันที่ 22 ถึงวันที่ 35 ของการทำ Chronic mild stress และจะทำการบริหารยาโดยการฉีดเข้าช่องท้องในช่วงเวลา 9.00-11.00 น.

หมายเหตุ จะเลือกส้มโอสายพันธุ์ที่ให้ผลที่ดีที่สุดจาก 2 การทดลองแรก

3) Sucrose consumption test

ทดสอบพฤติกรรมการบริโภคซูโครสในทุกๆสัปดาห์ของการทดลอง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยก่อนที่จะทดสอบจะต้องให้หนูอดอาหารและน้ำก่อนเป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นให้สารละลายน้ำตาลซูโครส 2% กับหนูเม้าส์ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณปริมาณซูโครสที่หนูเม้าส์แต่ละตัวได้รับเข้าไปในช่วงเวลาดังกล่าว เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างหนู nonstress, หนูที่ได้รับ CMS และหนูที่ได้รับ CMS+สารสกัดส้มโอ ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร นอกจากนี้ให้เปรียบเทียบผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงการบริโภคสารละลายซูโครสเทียบกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน

3.3.2 ทดสอบ Tail suspension test ในหนูเม้าส์ที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

หลังจากได้รับยาไปแล้ว 60 นาที หนูแต่ละตัวถูกนำมาทดสอบ tail suspension test ซึ่งการทดสอบนี้ จะเป็นแบบทดสอบที่นิยมใช้ในการตรวจสอบหรือคัดกรองฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้าของยา โดยภาวะเครียดที่เกิดขึ้นกับหนูเม้าส์ คือการที่หนูถูกแขวนลอยอยู่ในอากาศในท่าทางที่ผิดปกติ คือเอาหัวห้อยลงมา หนูจะพยายามขยับตัว เพื่อหนี หรือให้หลุดพ้นจากการอยู่ในท่าทางแบบนั้น ดังนั้นหนูที่ไม่มีการเคลื่อนไหวหรือไม่พยายามหนี สามารถแปลผลได้จากที่ immobility time ที่สูงว่าหนูตัวนั้นมีพฤติกรรมซึมเศร้า แต่ถ้าในหนูที่ได้รับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน ค่า immobility time จะมีค่าน้อยมาก และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับหนูที่ได้รับเพียงน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว การทดสอบทำได้โดยการนำเทปขาวพันติดที่หางของหนูเม้าส์ ห่างจากปลายหางประมาณ 1 ซม. จากนั้นนำหนูไปแขวนในเครื่องมือ tail suspension apparatus จับเวลาทั้งหมด 6 นาที บันทึกค่า Immobility time ในหนูเม้าส์ แต่ละตัว บันทึกวิดีโอขณะทำการทดลองด้วยทุกครั้ง และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมช่วยบันทึกเวลา

3.3.3 ทดสอบ Forced swimming test ในหนูเม้าส์ที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

แบบจำลอง Forced swimming test เป็นแบบจำลองที่ใช้ทดสอบภาวะซึมเศร้าในหนูเม้าส์ โดยการปล่อยหนูลงว่ายน้ำในถังน้ำแคบๆที่ไม่มีทางหนี หนูที่ไม่มีความพยายามว่ายน้ำหรือตะเกียกตะกายเพื่อหนีออกจากถังน้ำ จะมีค่า Immobility time สูง แต่ถ้าหนูที่ได้รับยาต้านซึมเศร้า จะมีค่า Immobility time ต่ำกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ก่อนทำการทดสอบ forced swimming test 1 วัน จะต้องทำการฝึกหนูให้ว่ายน้ำ โดยฝึกหนูว่ายน้ำในถังแก้วทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 ซม. สูง 22 ซม. ซึ่งบรรจุน้ำสูงประมาณ 10 ซม. เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้หนูเม้าส์ได้รู้สภาวะที่ไม่มีทางหนี หลังการให้ยา 60 นาที ทดสอบพฤติกรรม

- Forced swimming test โดยวัดเป็นเวลาที่ไม่มีการเคลื่อนไหวหลังจากที่ปล่อยลงสู่ถังน้ำ เวลาที่หนูอยู่ในถังน้ำ คือ 6 นาที แต่จะจับเวลาในช่วง 4 นาทีสุดท้าย โดยจะบันทึกภาพวิดีโอตลอดการทดลองเพื่อสังเกตพฤติกรรมหนูแต่ละตัวที่ได้รับ treatment ที่ต่างกัน

3.3.4 ทดสอบ locomotor activity ด้วยวิธี Y maze test

Y maze test แบบจำลองนี้จะทดสอบ locomotor activity เพื่อดูผลของยาว่ามีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity หรือไม่ เป็นการกำจัด false positive ออกไป โดยที่ยาที่มีฤทธิ์ด้านซึมเศร้าจะไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity โดยปล่อยหนูลงไปพื้นฐานของ maze รูปตัว Y นับจำนวนแขนที่หนูเดินใน Y Maze จับเวลา 5 นาที บันทึกผลเป็นจำนวนช่องที่หนูเดินใน Y Maze (number of arm entries)

3.4 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะซึมเศร้า BDNF, และ neuropeptide Y (NPY) โดยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

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

1) Total RNA extraction

ทำการ 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 pipette ส่วนใสด้านบนอย่างระมัดระวังใส่ใน tube อันใหม่. เติม 0.5 ml ของ isopropyl alcohol ต่อ 1 ml of TRIzol Reagent ทำการ Incubate ตัวอย่างที่ $15 - 30^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง $12,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจะได้ตะกอนของ RNA ซึ่งมีลักษณะคล้าย gel-like pellet ตกอยู่ด้านล่างของ tube ค่อยๆเทส่วน supernatant ออกแล้วทำการล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol 1 ml เขย่าผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $7,500 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างตะกอนซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ปล่อยให้ตะกอน RNA แห้ง แล้วทำการละลาย RNA pellet ด้วย 40 μl RNase free water เก็บรักษา RNA stock solution ที่ -20°C

2) Reverse transcription

Pipette 2 μl ของ 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 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 นำสารผสมที่ได้ใส่ลงในเครื่อง PCR ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C for 5 min แล้วเก็บไว้ใน 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 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF และ neuropeptide Y; NPY) and product length.

Gene	Primer Sequence Top line : forward primer Bottom line : reverse primer	Product length
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
NYP	5'- TGC TAG GTA ACA AGC GAA TGG-3' 5'- TGT CTC AGG GCT GGA TCT CT-3'	195 bp

3) Semi-quantitative RT-PCR

The PCR reaction mixture ประกอบด้วย 1 μ l of cDNA, 4 μ l of 5x PCR buffer, 2 μ l of deoxynucleoside triphosphate mixture, 2 μ l of magnesium chloride, 2 μ l of primer pair (ตารางที่ 5), 0.4 μ l of Taq polymerase และ 8.6 μ l of distilled water ปริมาตรรวมทั้งสิ้น 20 μ l. 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

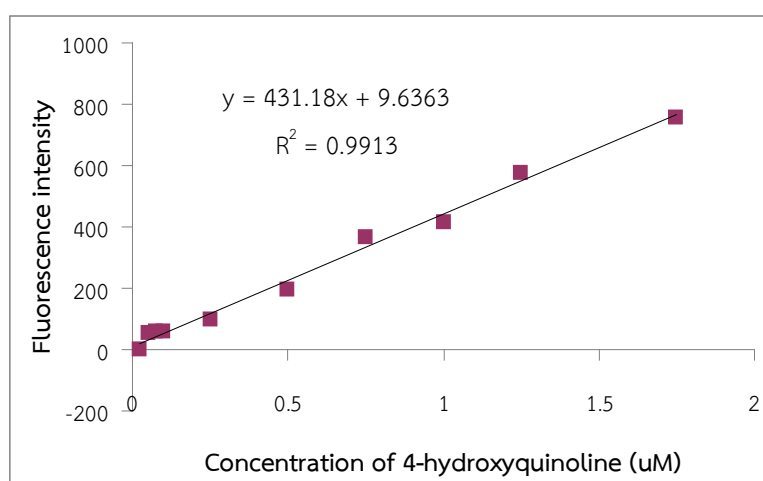
ใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างหนูเมาส์ปกติและหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้า และเปรียบเทียบผลการรักษาภาวะซึมเศร้าระหว่างสารสกัด และยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน ทั้งในด้านการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การแสดงออกของยีน และภาวะเครียดออกซิเดชันข้อมูลถูกแสดงเป็น 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

ผลการศึกษา

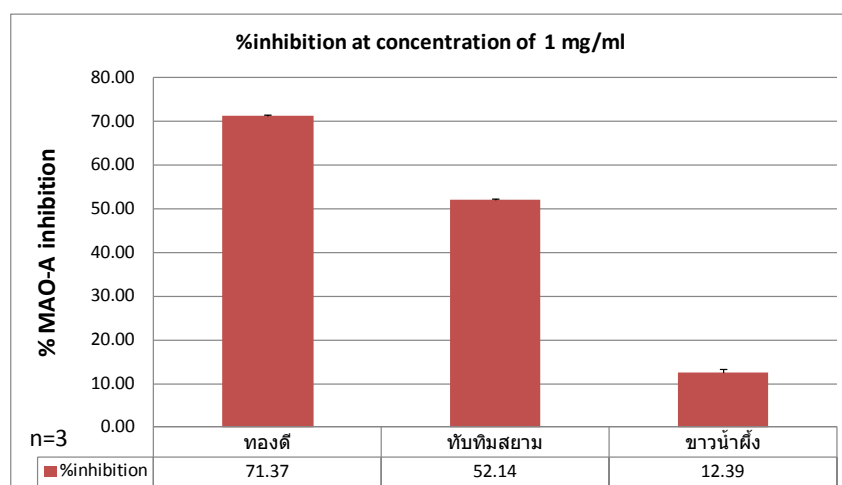
3.1 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และชาวน้ำผึ้ง ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B โดยวิธี kynuramine deamination assay

3.1.1 การคัดกรองฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และชาวน้ำผึ้ง ที่ความเข้มข้น 1000 μ g/mL

สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาวน้ำผึ้ง รวมทั้ง clorgyline (positive control สำหรับ MAO-A) ได้ถูกนำมาคัดกรองฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ด้วยวิธี kynuramine deamination assay ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ เพื่อดูถึงศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ การทดสอบโดยวิธีนี้ได้ใช้ kynuramine เป็น substrate (45 μM) ซึ่งจะถูกละลายโดยเอนไซม์ MAO-A ได้เป็น 4-hydroxyquinoline ที่สามารถเรืองแสงได้ที่ $\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$ ถ้าสารสกัดมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ปริมาณของ 4-hydroxyquinoline ที่เกิดขึ้นก็จะลดลง ซึ่งผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะแสดงเป็น % inhibition จากการทดลอง ได้กราฟมาตรฐานของสารละลาย 4-hydroxyquinoline แสดงในรูปที่ 16 และพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ได้ ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 16 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย 4-hydroxyquinoline

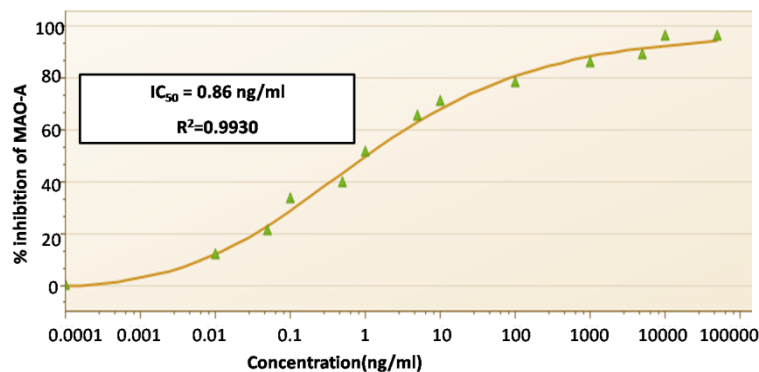


รูปที่ 17 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาวน้ำผึ้ง ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A

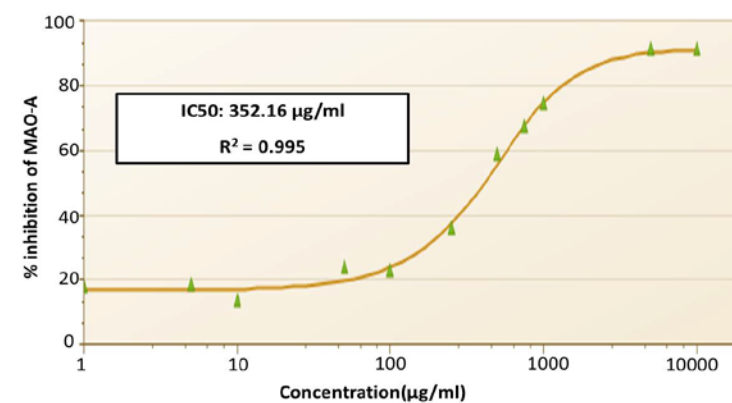
ผลการทดลอง พบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดีที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ด้วยค่า % inhibition เท่ากับ 71.37% ทับทิมสยามค่า % inhibition เท่ากับ 52.14% และ ขาวน้ำผึ้ง เท่ากับ 12.39 % ดังรูปที่ 5 ซึ่งค่าความเข้มข้นที่ 1 mg/mL นั้นเป็นค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการคัดกรองฤทธิ์ ถ้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไม่ได้ถึง 50% ก็จะไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้จึงไม่นำสารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3.1.2 การหาค่า IC_{50} ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และทับทิมสยาม ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A

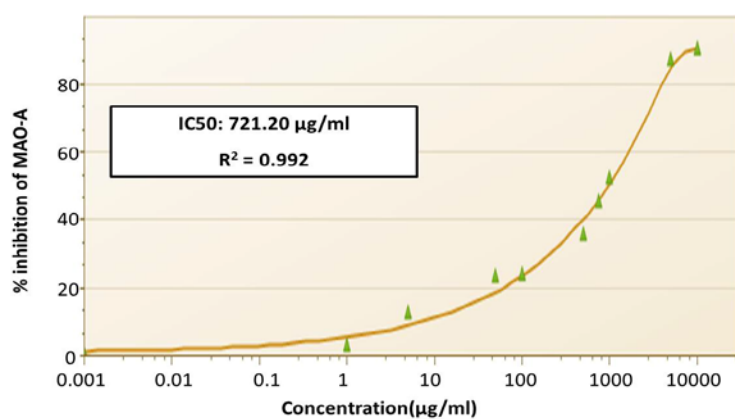
จากการคัดกรองฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาวน้ำผึ้ง ที่ความเข้มข้น 1000 ug/mL พบว่าเฉพาะสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และทับทิมสยามเท่านั้นที่มี มีศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ได้มากกว่า 50 % inhibition ดังนั้น จึงหาค่า IC_{50} ของสารสกัดผลไม้ทั้งหมด โดยหาค่า % inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัด ทั้งหมด 11-12 ความเข้มข้น เพื่อนำมาสร้าง sigmoidal dose response curve และหาค่า IC_{50} ของ clorgyline ซึ่งเป็น MAO-A inhibitor (positive control) ด้วย จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของ clorgyline ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A ได้ 50 % (IC_{50}) เท่ากับ 0.86 nM ดังแสดงในรูปที่ 18 และ ค่า IC_{50} ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ทับทิมสยาม แสดงได้ในรูปที่ 19 และสรุปในตารางที่ 5



รูปที่ 18 ผลของ clorgyline ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และค่า IC_{50}



ส้ม โอ พันธุ์ ทอง ดี



ส้ม โอ พันธุ์ ทับ ทิม สยาม

รูปที่ 19 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และทับทิมสยาม ในการยับยั้งเอนไซม์ MAO-A และ ค่า IC_{50}

ตารางที่ 6 ค่า IC_{50} ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาวน้ำผึ้ง ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A

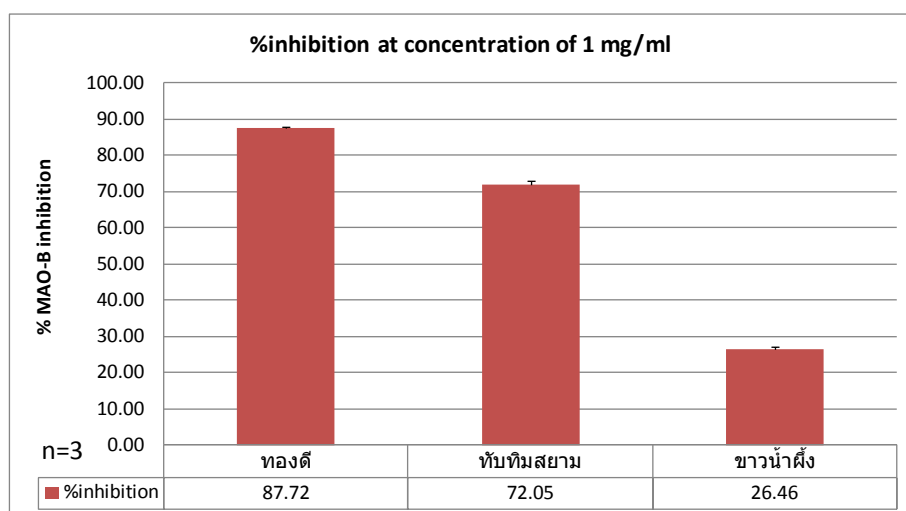
ชนิดของสารสกัด	ค่า IC_{50} (ug/ml)
สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี	352.16 ± 8.03
สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม	721.20 ± 3.82
สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	ND

ND = not determined

3.1.3 การคัดกรองฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาวน้ำผึ้ง ที่ความเข้มข้น 1000 ug/mL

สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาน้ำผึ้ง รวมทั้ง deprenyl (positive control สำหรับ MAO-B) ได้ถูกนำมาคัดกรองฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ด้วยวิธี kynuramine deamination assay ก่อนที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ เพื่อดูถึงศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ การทดสอบโดยวิธีนี้ได้ใช้ kynuramine เป็น substrate (30 μM) ซึ่งจะถูกละลายโดยเอนไซม์ MAO-B ได้เป็น 4-hydroxyquinoline ที่สามารถเรืองแสงได้ที่ $\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$ ถ้าสารสกัดมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ปริมาณของ 4-hydroxyquinoline ที่เกิดขึ้นก็จะลดลง ซึ่งผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะแสดงเป็น % inhibition จากการทดลอง พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้ ดังแสดงในรูปที่ 20

ผลการทดลอง พบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดีที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ด้วยค่า % inhibition เท่ากับ 87.72% ทับทิมสยามค่า % inhibition เท่ากับ 72.05% และ ขาน้ำผึ้ง เท่ากับ 26.46 % ซึ่งค่าความเข้มข้นที่ 1 mg/mL นั้นเป็นค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการคัดกรองฤทธิ์ ถ้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไม่ได้ถึง 50% ก็จะไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้จึงไม่นำสารสกัดส้มโอพันธุ์ขาน้ำผึ้งไปทำการทดลองขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 20 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาน้ำผึ้ง ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B

3.1.4 การหาค่า IC_{50} ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาน้ำผึ้ง ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B

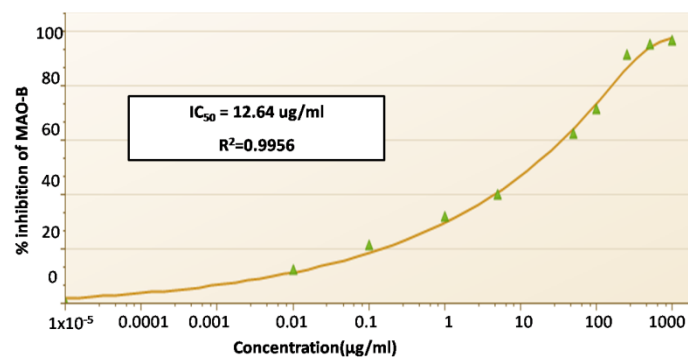
จากการคัดกรองฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาน้ำผึ้ง ที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ พบว่ามีเพียง สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และทับทิมสยาม ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้มากกว่า 50 % inhibition ดังนั้น จึงหาค่า IC_{50} ของสารสกัดผลไม้ทั้งสองชนิด โดยหาค่า % inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัด ทั้งหมด 11-12 ความเข้มข้น เพื่อนำมาสร้าง sigmoidal dose response curve และหาค่า IC_{50} ของ deprenyl ซึ่งเป็น MAO-B inhibitor (positive control) ด้วย

จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของ deprenyl ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้ 50 % (IC_{50}) เท่ากับ 12.64 nM ดังแสดงในรูปที่ 21 และ ค่า IC_{50} ของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังแสดงได้ในรูปที่ 22 และตารางที่ 7

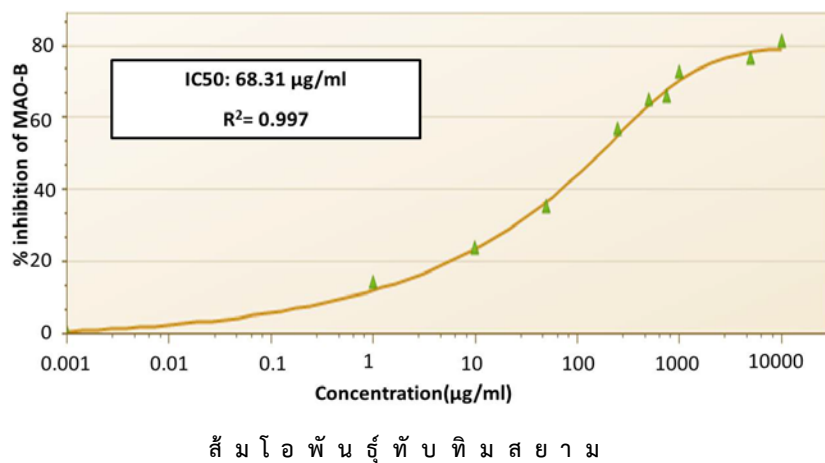
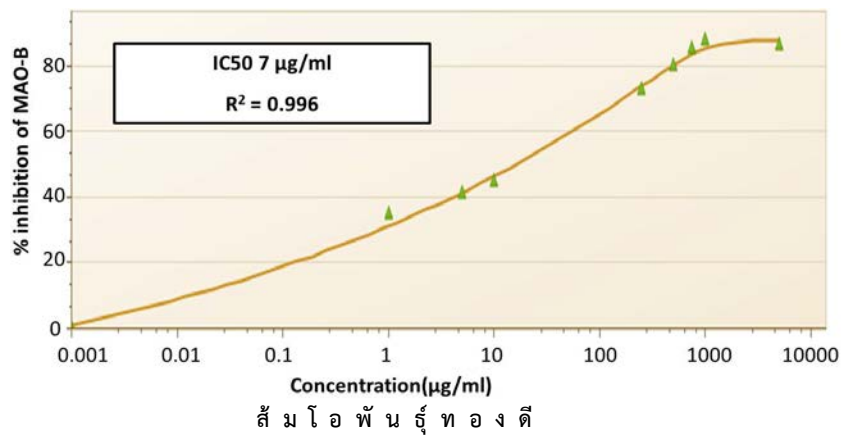
ตารางที่ 7 ค่า IC_{50} ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี หับทิมสยาม และขาวน้ำผึ้ง ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B

ชนิดของสารสกัด	ค่า IC_{50} (ug/ml)
สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี	6.99 ± 1.13
สารสกัดส้มโอพันธุ์หัททิมสยาม	68.39 ± 9.42
สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	ND

ND = not determined



รูปที่ 21 ผลของ deprenyl ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B และค่า IC_{50}



รูปที่ 22 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และทับทิมสยาม ในการยับยั้งเอนไซม์ MAO-B และค่า IC₅₀

จากค่า IC₅₀ ที่หาได้จากการทดลอง สามารถนำไปคำนวณเป็นค่า selective Index สำหรับเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ดังแสดงผลได้ในตารางที่ 8

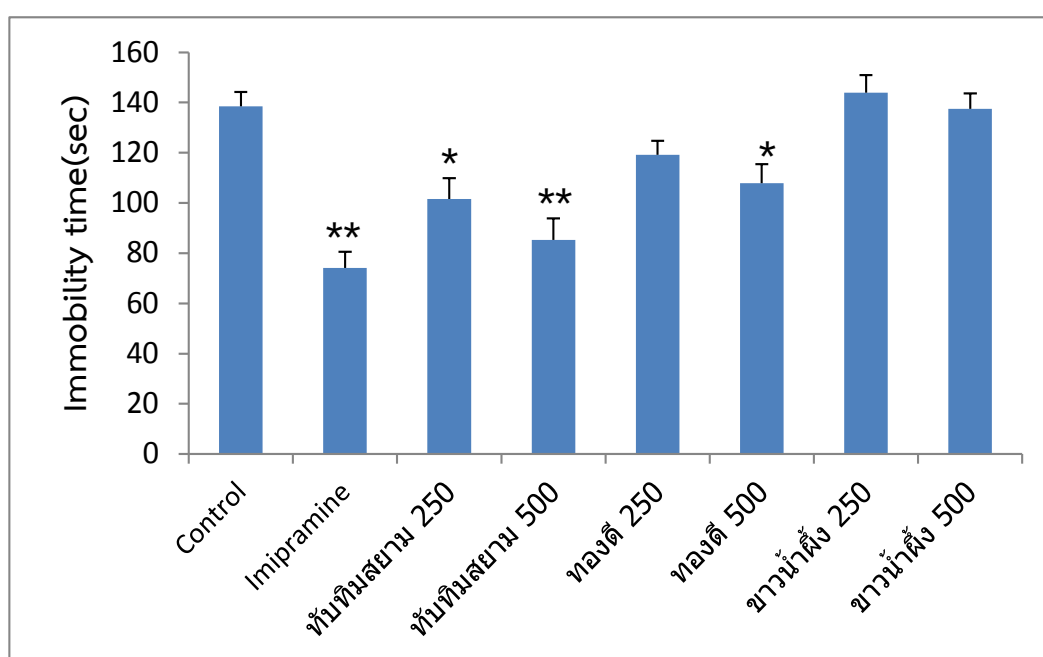
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และทับทิมสยาม ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

สารสกัด	MAO-A (IC ₅₀ , ug/ml)	MAO-B (IC ₅₀ , ug/ml)	Selective Index for MAO-B Ratio of IC ₅₀ (MAO-A)/IC ₅₀ (MAO-B)	Selective Index for MAO-A Ratio of IC ₅₀ (MAO-B)/IC ₅₀ (MAO-A)
สารสกัดส้มโอทองดี	352.16±8.03	6.99±1.13	50.38	0.02
สารสกัดส้มโอทับทิมสยาม	721.20±3.82	68.39±9.42	10.55	0.09

3.2 ผลการทดสอบสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมซึมเศร้าในหนูปกติ โดยใช้แบบทดสอบ Tail suspension test และ forced swimming test

3.2.1 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาน้ำผึ้ง ต่อค่า Immobility time ในแบบทดสอบ Tail suspension test ในหนูเม้าส์ปกติ

สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม สามารถลด immobility time ในหนูเม้าส์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเม้าส์กลุ่มควบคุมที่ได้รับ vehicle และการลดลงของค่า immobility time แปรตามขนาดที่ได้รับสารสกัด สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดีและทับทิมสยามขนาด 500 มก./กก. ให้ค่า immobility time เท่ากับ 85.33 ± 8.57 วินาที และ 107.85 ± 7.57 วินาทีตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับยา imipramine ขนาด 25 มก./กก. ซึ่งให้ค่า immobility time เท่ากับ 74.15 ± 6.36 วินาที พบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามสามารถลดค่า immobility time ได้ไม่แตกต่างจากยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน ส่วนสารสกัดส้มโอพันธุ์ขาน้ำผึ้ง ไม่มีฤทธิ์ในการลด immobility time ในหนูเม้าส์ ดังแสดงในรูปที่ 23

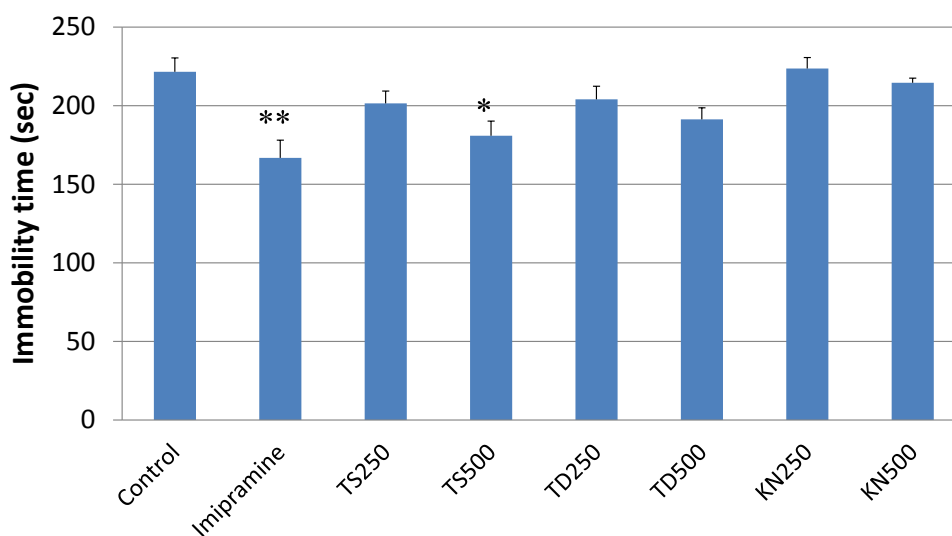


รูปที่ 23 ฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าแสดงเป็น Immobility time (sec) ในหนูเม้าส์เพศผู้โดย Tail Suspension Test (TST) ของสารสกัดจากส้มโอ 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ทองดี และขาน้ำผึ้ง (250, 500 mg/kg B.W.) และ ยาด้านภาวะซึมเศร้า (Imipramine 25 mg/kg B.W.) จำนวนหนูแต่ละกลุ่ม 8 ตัว ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ เปรียบเทียบกับ กลุ่ม Control

3.2.2 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาน้ำผึ้ง ต่อค่า Immobility time ในแบบทดสอบ forced swimming test ในหนูเม้าส์ปกติ

สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม สามารถลด immobility time ในหนูเม้าส์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเม้าส์กลุ่มควบคุมที่ได้รับ vehicle และการลดลงของค่า immobility time ขึ้นกับขนาดยาที่ได้รับ โดยขนาดยาที่สูง 500 mg/kg จะลดค่า immobility time ได้ดีกว่าขนาดยา 250 mg/kg ด้วยค่า immobility time = 180.91 ± 8.87 วินาที (* $p < 0.05$) และ

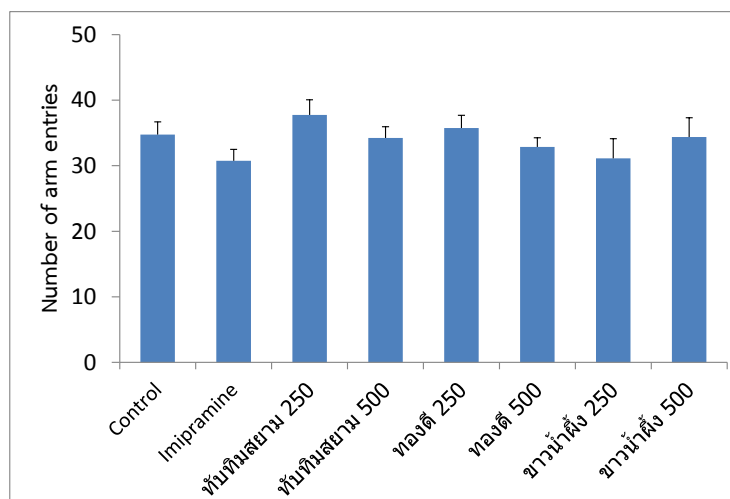
201.47 ± 7.43 วินาที ตามลำดับ และให้ผลดีเทียบเท่ากับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน Imipramine ซึ่งให้ค่า immobility time = 166.79 ± 10. วินาที (** $p < 0.01$) ในขณะที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และ ส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ไม่สามารถลด immobility time ในหนูเมาส์ได้แบบทดสอบนี้ ดังแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24ฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าแสดงเป็น Immobility time (sec) ในหนูเมาส์เพศผู้โดย Forced swimming test (FST) ของสารสกัดจากส้มโอ 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ทองดี และขาวน้ำผึ้ง (250, 500 mg/kg B.W.) และ ยาด้านภาวะซึมเศร้า (Imipramine 25 mg/kg B.W.) จำนวนหนูแต่ละกลุ่ม 8-10 ตัว ข้อมูลแสดงค่า Mean ± S.E.M., ** $p < 0.01$ และ * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ กลุ่ม Control

3.2.3 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาวน้ำผึ้ง ต่อ locomotor activity ในแบบทดสอบ Y-maze test ในหนูเมาส์ปกติ

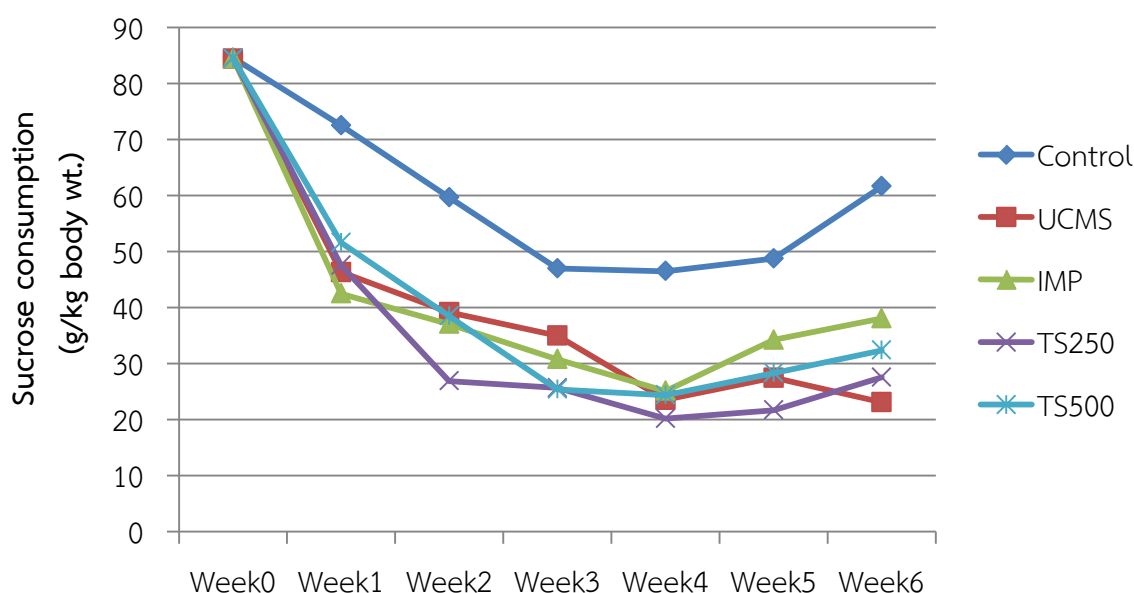
จากการทดลองพบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาวน้ำผึ้ง ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมปกติ เช่นเดียวกับ imipramine ดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 ผลของสารสกัดส้มโอต่อ locomotor activity ของหนูเมาส์ในแบบทดสอบ Y maze test (mean±S.E.M, n=8)

3.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ต่อการต้านภาวะซึมเศร้าในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปโดยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

3.3.1 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการบริโภคซูโครสในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าด้วยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน



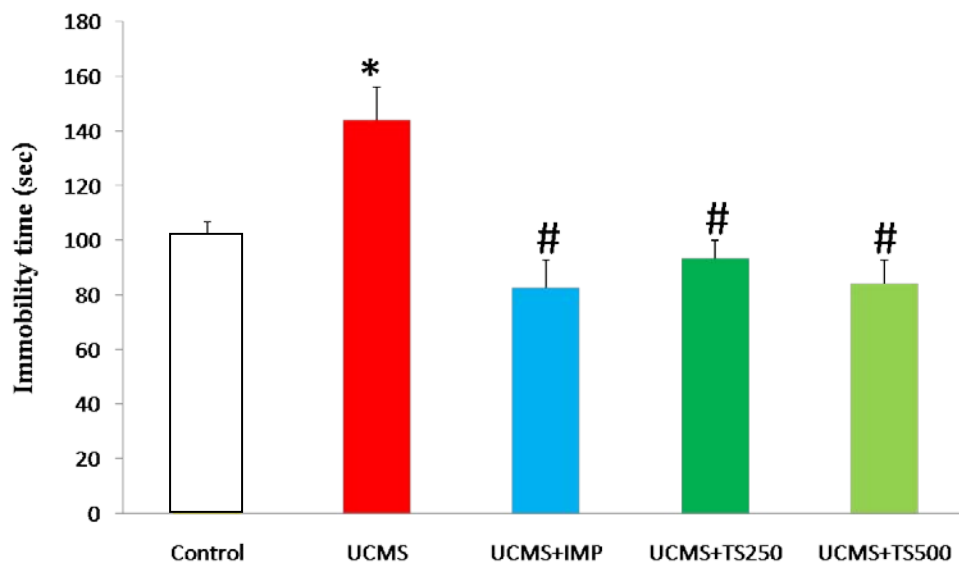
รูปที่ 26 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการบริโภคน้ำตาลในแต่ละสัปดาห์ของหนูที่ได้รับ ความเครียดสะสม จำนวนหนูแต่ละกลุ่ม 8-10 ตัว

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า หนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดจะมีการบริโภคน้ำตาลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-6 แต่เมื่อได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในขนาด 500 mg/kg/day เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าหนูทดลองมีการบริโภคน้ำตาลที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดและได้รับน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว และลดความเครียดได้ใกล้เคียงกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine ขนาด 20 mg/kg/day ดังแสดงในรูปที่ 26

3.3.2 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ต่อค่า Immobility time ในแบบทดสอบ Tail suspension test ในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าด้วยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

จากผลการทดลองพบว่าหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน จะมีค่า immobility time สูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value <0.05) และเมื่อหนูที่ได้รับความเครียดสะสมเป็นระยะเวลานานร่วมกับการได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิม

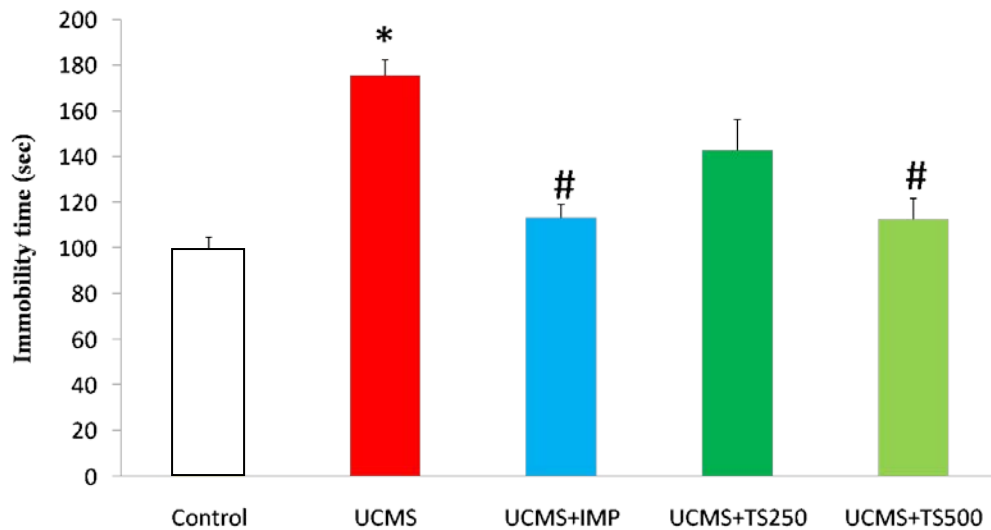
สยาม ในขนาด 250 และ 500 mg/kg/day เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ จะมีค่า immobility time ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับความเครียดสะสมและได้รับน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว และพบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามสามารถลดค่า immobility time ได้ไม่แตกต่างจากยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน Imipramine ในขนาดยา 25 mg/kg/day, i.p.



รูปที่ 27 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการลดภาวะซึมเศร้าในแบบจำลอง Tail Suspension Test (TST) จำนวนหนูแต่ละกลุ่ม 8-10 ตัว ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ กลุ่ม Control และ # $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม UCMS

3.3.3 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อค่า Immobility time ในแบบทดสอบ forced swimming test ในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าด้วยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

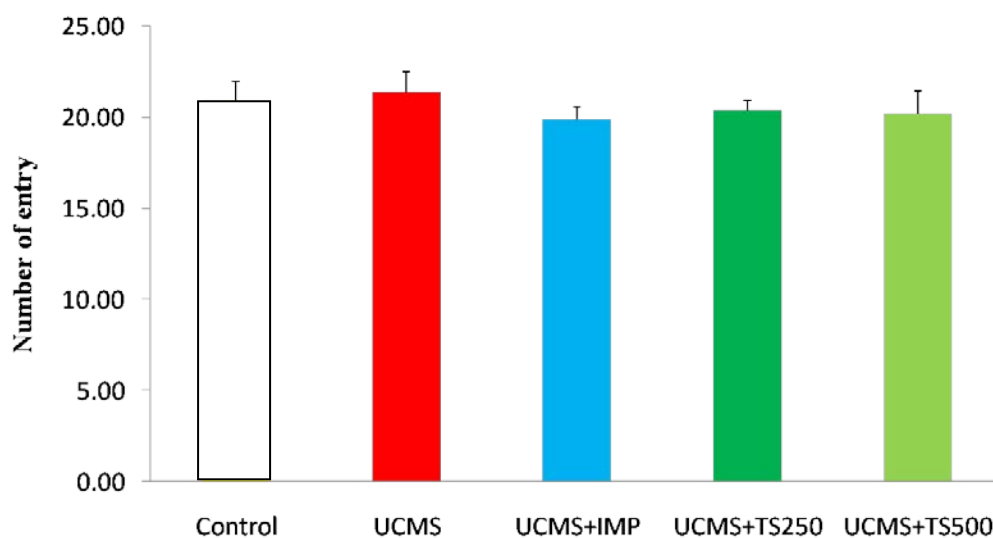
จากผลการทดลองพบว่าหนูที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน จะมีค่า immobility time สูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อหนูที่ได้รับความเครียดร่วมกับการได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ในขนาด 500 mg/kg/day จะมีค่า immobility time ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับความเครียด และการลดลงของค่า immobility time แปรตามขนาดที่ได้รับสารสกัด สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม สามารถที่จะลดค่า immobility time ได้ไม่แตกต่างกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine ขนาดยา 25 mg/kg/day, i.p. ดังรูปที่ 28



รูปที่ 28 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการลดภาวะซึมเศร้าในแบบจำลอง Forced swimming test (FST) จำนวนหนูแต่ละกลุ่ม 8-10 ตัว ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ กลุ่ม Control และ # $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม UCMS

3.3.4 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ ทับทิมสยาม ต่อ locomotor activity ในแบบทดสอบ Y-maze test ในหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะซึมเศร้าด้วยการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

เพื่อต้องการตรวจสอบว่าผลในการลด immobility time นั้น ไม่ได้มีผลมาจากการที่ยาหรือสารสกัดส้มโอนั้นไปมีผลต่อ locomotor activity จึงได้ทำการทดสอบ locomotor activity ด้วยแบบทดสอบ Y-Maze ด้วย จากการทดลองพบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมปกติ เช่นเดียวกับ imipramine ซึ่งเป็นยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน ดังรูปที่ 29

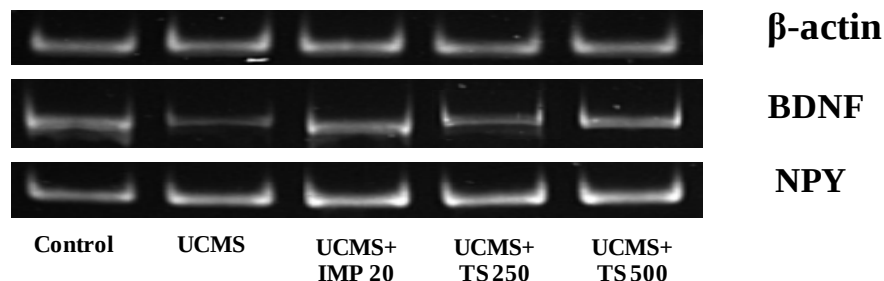


รูปที่ 29 ผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อ locomotor activity ของหนูเมาส์ที่ได้รับ UCMS ในแบบทดสอบ Y maze test (mean±S.E.M, n=8-10)

3.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามต่อการแสดงออกของยีน BDNF และ NPY ในหนูทดลองที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน

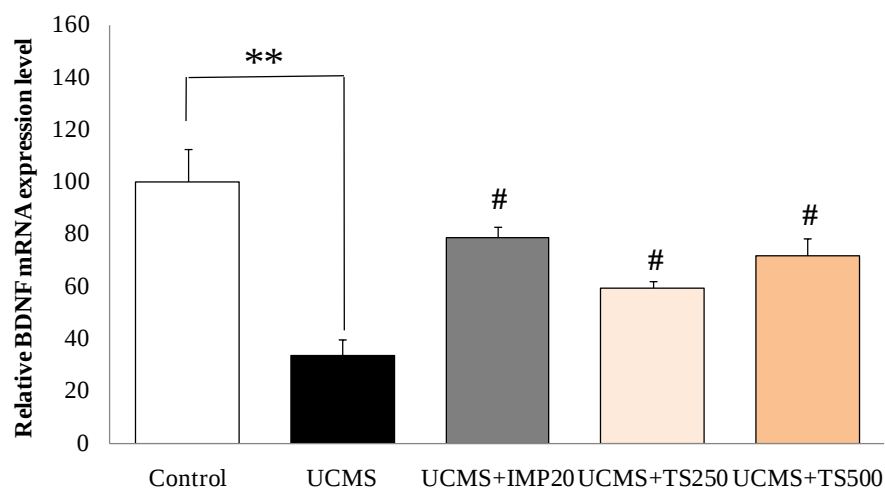
จากการทดสอบพบว่า การให้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานจะมีผลลดการแสดงออกของยีน BDNF mRNA ทั้งในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อหนูเมาส์ได้รับความเครียดอย่างอ่อนร่วมกับการได้รับส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยาม พบว่าส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามขนาด 250 และ 500 mg/kg, p.o. สามารถเพิ่มการแสดงออกของ BDNF mRNA ได้ทั้งในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus เช่นเดียวกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine และยังพบว่า การให้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานไม่มีผลต่อการแสดงออกของ NPY mRNA ทั้งในสมองส่วน frontal cortex และ hippocampus ดังแสดงในรูปที่ 30 และ 31

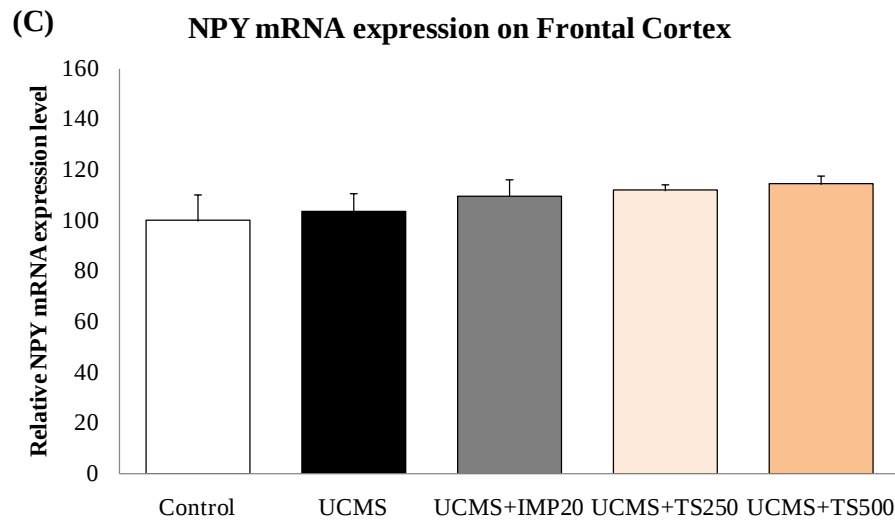
(A)



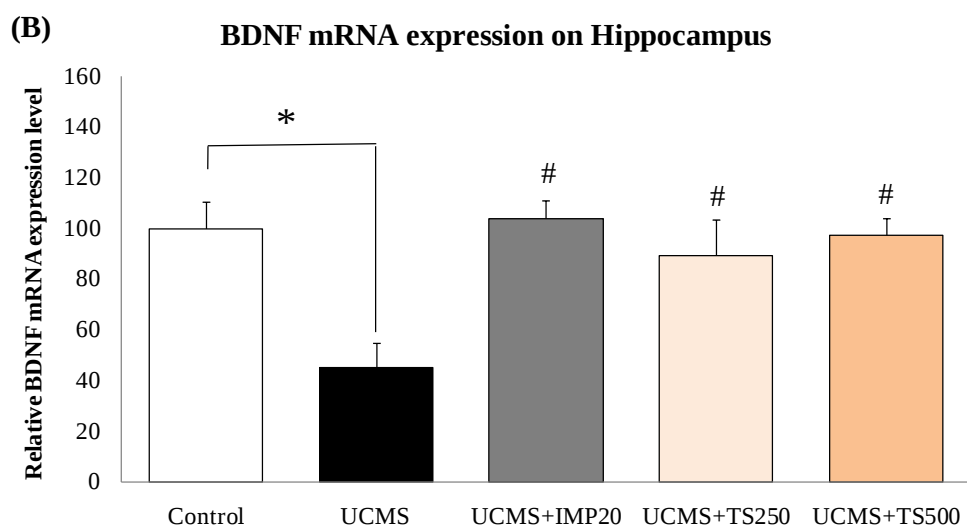
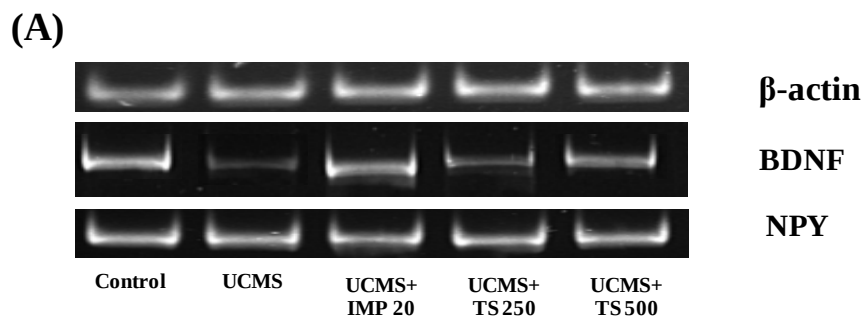
(B)

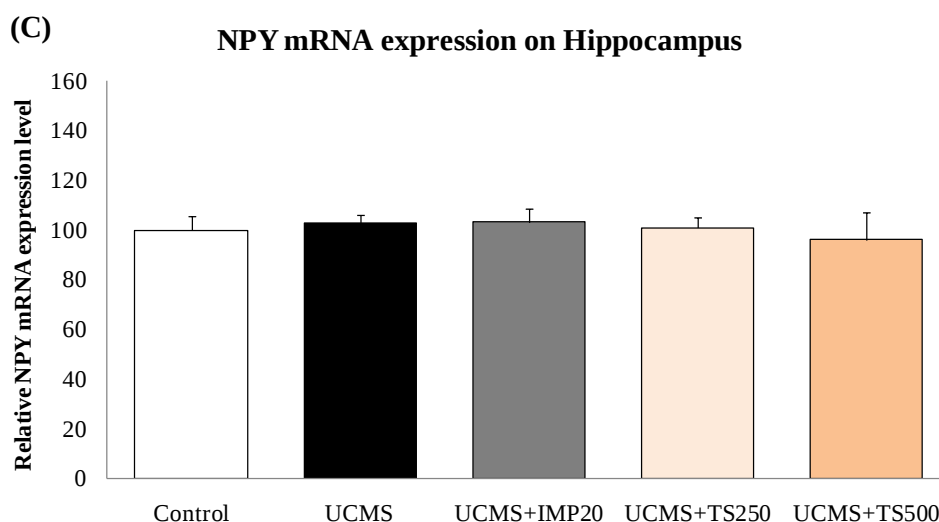
BDNF mRNA expression on Frontal Cortex





รูปที่ 30 ผลของส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามต่อการแสดงออกของ BDNF และ NPY mRNA ในสมองส่วน frontal cortex ในหนูทดลองกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน (mean $\pm$ S.E.M, n = 4). (** P < 0.001 vs. control group and # P < 0.05 vs. UCMS group) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test)





รูปที่ 31 ผลของส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามต่อการแสดงออกของยีน BDNF และ NPY mRNA ในสมองส่วน hippocampus ในหนูทดลองกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน (mean $\pm$ S.E.M, n = 4). (* P < 0.05 vs. control group and # P < 0.05 vs. UCMS group) (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test)

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อคัดกรองฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชั่น และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัด 3 ชนิด คือ สารสกัดผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ทองดี และทับทิมสยาม พบว่าสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น แรงที่สุดทั้งใน model ABTS assay และ DPPH assay สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส และจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) ถึงฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และ beta amyloid ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 พันธุ์มีฤทธิ์ดีในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และจาก beta amyloid

จากการศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแบบจำลองสัตว์ทดลอง โดยใช้โมเดลศึกษา คือ Morris Water Maze สำหรับวัดผล long-term memory และ Y-maze test สำหรับวัดผล short-term memory พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามสามารถใช้เวลาในการว่ายวนใน quadrant ที่เคยวางแผ่นรองไว้ ในการทดสอบ Morris water maze ของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม scopolamine นอกจากนี้สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามยังสามารถเพิ่ม % alternation ในการทดสอบ Y-maze test ของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ scopolamine เพียงอย่างเดียว ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่า ทั้งสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีผลป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูก

เหนี่ยวนำโดย Scopolamine ได้ โดยมีผลทั้ง spatial short-term memory (ความจำระยะสั้น) และ spatial long term memory (ความจำระยะยาว)

จากผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ทับทิมสยาม และขาน้ำผึ้ง ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B โดยวิธีหลอดทดลอง (*In Vitro*) ได้ผลสรุปดังตารางที่ 8 สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และทับทิมสยาม มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ในขณะที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาน้ำผึ้งนั้นไม่มีศักยภาพเพียงพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองตัว เนื่องจากว่าที่ความเข้มข้นที่ 1 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดนั้น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ได้เพียง 12.39 % และ 26.46% ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ทองดี และทับทิมสยามมาทำการทดสอบขั้นต่อไปเพื่อหาค่า IC_{50} จากการทดลองพบว่า โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-A activity ได้ดีที่สุดคือ สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ด้วยค่า IC_{50} 352.16 ± 8.03 ug/mL ส่วนสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม มีค่า IC_{50} 721.20 ± 3.82 ug/mL ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ MAO-B สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดียับยั้งได้ดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} 6.99 ± 1.13 ug/mL ส่วนสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม มีค่า IC_{50} 68.39 ± 9.42 ug/mL และเมื่อนำค่า IC_{50} ของแต่ละสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B มาคำนวณค่า Selectivity Index (SI) จะพบว่า ทั้งทองดี และทับทิมสยามนั้นมีความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดีมีค่า selective index ต่อ MAO-B สูงเท่ากับ 50.38

ส่วนการคัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าในหนูทดลองด้วยวิธี tail suspension test และ forced swimming test พบว่า เฉพาะสารสกัดส้มโอทับทิมสยามเท่านั้น ที่มีผลในการลดค่า immobility time ได้ทั้งสองแบบทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม และความสามารถของสารสกัดในการลดค่า Immobility time โดยแบ่งตามขนาดที่ให้ คือขนาดยาสูง (500 mg/kg) จะลดค่า Immobility time ได้ดีกว่าขนาดยาต่ำ (250 mg/kg) ส่วนส้มโอพันธุ์ทองดี จะลดค่า immobility time ได้เฉพาะในแบบทดสอบ tail suspension test เท่านั้น โดยไม่มีผลลดค่า immobility time ได้อย่างมีนัยสำคัญในแบบทดสอบ forced swimming test ส่วนสารสกัดส้มโอพันธุ์ขาน้ำผึ้งนั้นไม่มีผลในการลดพฤติกรรมซึมเศร้าได้เลยจากทั้ง 2 แบบทดสอบ การที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาน้ำผึ้งไม่มีฤทธิ์ทั้งในแบบทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ และการลดภาวะซึมเศร้านั้น น่าจะเป็นผลมาจากที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาน้ำผึ้งนี้ มีปริมาณสารสำคัญจำพวกฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก และแคโรทีนอยด์ น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับส้มโอพันธุ์ทองดีและทับทิมสยาม

ดังนั้นจากการคัดกรองฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้าเบื้องต้นของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือทับทิมสยาม ทองดี และขาน้ำผึ้ง จะมีเพียงทับทิมสยามเท่านั้นที่จะถูกนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยใช้แบบจำลองหนูไม่ชี้ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการเลี้ยงภายใต้ความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน unpredictable chronic mild stress (UCMS) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีศักยภาพในการต้านภาวะซึมเศร้าในแบบจำลอง UCMS โดยหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดจะมีการบริโภคน้ำตาลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-6 ซึ่งพฤติกรรมนี้จะบ่งบอกถึงภาวะ anhedonia ซึ่งเป็นพฤติกรรมซึมเศร้า แต่เมื่อได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในขนาด 500 mg/kg/day เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าหนูทดลองมีการบริโภคน้ำตาลที่

เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดและได้รับน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว และลดความเครียดได้ใกล้เคียงกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine ขนาด 25 mg/kg/day นอกจากนี้ หนูที่ถูกเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน จะมีค่า immobility time ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่บ่งบอกถึงภาวะสิ้นหวัง สูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในแบบทดสอบ tail suspension test และ forced swimming test และเมื่อหนูที่ได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ในขนาด 250 และ 500 mg/kg/day เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ จะมีค่า immobility time ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับความเครียดสะสมและได้รับน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว และพบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามสามารถลดค่า immobility time ได้ไม่แตกต่างจากยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน Imipramine ในขนาดยา 25 mg/kg/day, i.p. โดยการลดลงของค่า immobility time นั้นไม่ได้เป็นผลมาจากการที่ยานี้ไปรบกวน locomotor activity ในหนูทดลอง ดังนั้นกลไกในการต้านภาวะซึมเศร้าของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม น่าจะเป็นผลเนื่องมาจากการเพิ่มการแสดงออกของยีน Brain derived neurotrophic factor (BDNF) จากการทดสอบด้วยวิธี polymerase chain reaction โดยหนูที่ได้รับความเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานานมีผลทำให้การแสดงออกของยีน BDNF ลดลงอย่างมากในสมองทั้ง frontal cortex และ hippocampus ซึ่งยีนดังกล่าวทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ neurogenesis ของเซลล์ประสาท มีผลทำให้เกิดการพัฒนาเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท โดยจะพบมากในสมองส่วน hippocampus (Mizuki et al., 2014) โดยที่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ neuropeptide Y (NPY) mRNA ที่ทำหน้าที่หลักเกี่ยวกับความเครียดและการตอบสนองต่อความเครียด ความอยากอาหาร สภาวะสมดุลของพลังงาน (Sergeyev et al., 2005) และฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้าอีกหนึ่งกลไก อาจจะเกี่ยวข้องกับการที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

โดยผลการทดสอบฤทธิ์ในการปกป้องสมอง พื้นฟูความจำ และฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ สอดคล้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารสำคัญในสารสกัดของผลส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ทองดี และ ขาวน้ำผึ้ง ที่เตรียมจากขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบ พบว่าส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม มีปริมาณสารสำคัญจำพวกฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ และ แอนโทไซยานินมากที่สุด รองลงมาคือพันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้งตามลำดับ จากการที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ไม่มีฤทธิ์ทั้งในแบบทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ และการลดภาวะซึมเศร้านั้น น่าจะเป็นผลมาจากที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งนี้ มีปริมาณสารสำคัญจำพวกฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ และ แอนโทไซยานินน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับส้มโอพันธุ์ทองดีและทับทิมสยาม

สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อคัดกรองฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ทองดี และทับทิมสยาม พบว่าสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แรงที่สุดทั้งใน model ABTS assay และ DPPH assay สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีลโคลีนเอสเทอเรส และจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 พันธุ์มีฤทธิ์ดีในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และจาก beta amyloid และฤทธิ์ในการป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแบบจำลองสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดจาก

ผลสัมฤทธิ์ของตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B พบว่า สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และทับทิมสยาม มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ในขณะที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งนั้นไม่มีศักยภาพเพียงพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองตัว และจากการทดสอบและคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ด้วยวิธี tail suspension test และ forced swimming พบว่า เฉพาะสารสกัดส้มโอทับทิมสยามเท่านั้น ที่ลดค่า immobility time ได้ทั้งสองแบบทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ส่วนสารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งนั้นไม่มีผลในการลดพฤติกรรมซึมเศร้า จากทั้ง 2 แบบทดสอบ ส่วนผลการศึกษาการต้านภาวะซึมเศร้าในแบบจำลอง UCMS ของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามสามารถลดพฤติกรรมซึมเศร้าเช่น ภาวะสิ้นยินดี (anhedonia) และ ภาวะสิ้นหวัง (hopeless) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดและได้รับน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว และลดความเครียดได้ใกล้เคียงกับยาต้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine โดยกลไกในการต้านภาวะซึมเศร้าของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามน่าจะมาจากการที่สารสกัดสามารถเพิ่มการแสดงออกของ BDNF mRNA ได้ทั้งในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex และอาจจะเกี่ยวข้องกับการที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B

หากมีการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึก โดยศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับกลไกในการฟื้นฟูความจำผ่านกลไกอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น การกระตุ้นการทำงานของ nicotinic receptor หรือ ผ่าน signaling pathway อื่นที่สัมพันธ์กับ apoptosis และกลไกที่เกี่ยวข้องกับผลของความเครียดต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน หรือการวัดระดับคอร์ติซอลในเลือด จะทำให้บอกได้ถึงกลไกต้านซึมเศร้าของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามได้อย่างชัดเจนมากขึ้น รวมถึงการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่พบมากในส้มโอเช่น naringin และ/หรือ hesperidin ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรมเพิ่มเติมพบว่าสารสำคัญทั้งสองตัวนี้มีฤทธิ์ต้านซึมเศร้าที่ดี และมีฤทธิ์ปกป้องสมอง ช่วยฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และจดจำได้ด้วย นอกจากนี้การพัฒนายอดโดยการแปรรูปผลิตภัณฑ์เป็นก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจ และสามารถเพิ่มมูลค่าของผลไม้ไทยชนิดนี้มากขึ้น และอาจจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรไทยในอนาคต เพราะมีข้อมูลหลักฐานเชิงวิชาการที่สามารถสนับสนุนการบริโภคผลไม้ไทยมากขึ้น เพื่อส่งเสริมสุขภาพ และชะลอความเสื่อมของเซลล์ประสาท และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทโดยตรง

เอกสารอ้างอิง

- 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
- Charoensiri R, Kongkachuichai R, Suknicom S, Sungpuag P. Beta-carotene, lycopene, and alphanatocopherol contents of selected Thai fruits. *Food Chem* 2009; 113: 202–207.
- Chularojmontri L, Gerdprasert O, and Wattanapitayakul SK. Pummelo Protects Doxorubicin-Induced Cardiac Cell Death by Reducing Oxidative Stress, Modifying Glutathione Transferase Expression, and Preventing Cellular Senescence. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 254835.
- 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.

- Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, et al. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons: higher than previously reported. *JAMA* 1989; 262: 2551-6.
- 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.
- Helbert LE, Beckett LA, Scherr PA, et al. Annual projected to the years 2000 through 2050. *Alzheimer Dis Assoc Discord* 2001; 15: 169-73.
- 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 NeuralTransm, Suppl.*, 1998; 54: 295-299.
- Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method. *J AOAC Int* 2005; 88(5): 1269-1278.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Tanizawa H, Ohkawa Y, Takino Y, Miyase T, Ueno A, Kageyama T, Hara S. (1992). Studies on natural antioxidants in citrus species. I. Determination of antioxidative activities of citrus fruits. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 40(7):1940-1942.

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 Dec;134(4):319-29

Zarotsky V, Sramek JJ, Cutler N R. Galantamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease. *Am J Health-Syst Pharm* 2003; 60: 446-452.

รณชัย คงสกนธ์, วีระเดช วีระพงศ์เศรษฐ์ และ อัญชลี เตมียะประดิษฐ์. ปัจจัยเสี่ยงของโรคซึมเศร้าการประชุมวิชาการสุขภาพจิตนานาชาติ, ครั้งที่ 4, เรื่องสุขภาพจิตกับภัยพิบัติ, วันที่ 6-8 กรกฎาคม 2548 ณ โรงแรมปรีณซ์พาเลซ, กรุงเทพมหานคร, หน้า 176.

ภาคผนวก

ก. บทความสำหรับการเผยแพร่

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

ส้มโอเป็นผลไม้ในตระกูลส้มที่ปลูกได้ดีในประเทศไทย และเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่มีศักยภาพในการส่งออก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Citrus maxima* (Burm.) Merrill เป็นพืชในวงศ์ Rutaceae โดยลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของส้มโอเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก แตกกิ่งก้านต่ำ กิ่งก้านแผ่ มีหนาม ใบเดี่ยว รูปไข่ถึงรูปรี โคนใบกลมถึงรูปหัวใจ ปลายใบแหลมและเว้า ขอบใบเรียบหรือหยักเป็นคลื่นตื้นๆ ช่อดอกออกตามซอกใบเป็นกระจุก ดอกมีกลิ่นหอม กลีบเลี้ยง 5 กลีบสีเขียว กลีบดอก 5 กลีบสีขาว เกสรเพศผู้ 10 ผลกลมโต บางพันธุ์ตรงข้ามมีจุดสูงขึ้นมา ผิวผลเมื่อยังอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จัดเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง ผิวของผลไม้เรียบ ผิวของเปลือกผลมีต่อมน้ำมันกระจายทั่วไป ภายในผลเป็นช่อง ๆ มีแผ่นบาง ๆ สีขาวกั้นเนื้อให้แยกออกจากกัน เนื้อแต่ละส่วนเรียกว่า "กลีบ" มีรสหวานหรือหวานอมเปรี้ยว มีเมล็ดฝังอยู่ระหว่างเนื้อมากกว่า 1 เมล็ด ผลส้มโอมีเปลือกหนาทำให้สามารถเก็บรักษาได้นาน ส้มโอเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในเมืองไทยในปัจจุบัน ได้มีความพยายามปรับปรุงพันธุ์ให้มีรสชาติ และมีขนาดของผลที่ใหญ่ขึ้นเพื่อเพิ่มมูลค่าของส้มโอ ปัจจุบันพันธุ์ส้มโอที่เป็นที่นิยมปลูกทางการค้าได้แก่ พันธุ์ขาวพวงซึ่งมีผลกลม มีจุดสูง ผิวเรียบ สีเปลือกเขียวอ่อนอมเหลือง มีเมล็ดน้อย เป็นพันธุ์ดั้งเดิม พันธุ์ทองดี ผลโต กลมแป้น ไม่มีจุด ที่ขั้วมีจิบเล็กน้อย รสหวาน ฉ่ำน้ำ เนื้อสีชมพู พันธุ์ขาวน้ำผึ้งมีผลใหญ่ กลมสูง ก้นเรียบ พันธุ์ขาวแตงกวา ผลขนาดกลาง กลมแป้น เปลือกบาง เนื้อสีขาว และพันธุ์ทับทิมสยาม ซึ่งลักษณะผลมีขนาดใหญ่ มีจุดสูง เปลือกบาง เนื้อสีชมพู

มีรายงานวิจัยพบว่าส้มโอมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Tanizawa et al., 1992) โดยพบสาร beta-carotene, lycopene, vitamin E, catechins และ flavonoids จากส่วนเนื้อที่รับประทานได้ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Charoensiri et al., 2009) จากการศึกษาในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนู พบว่าน้ำคั้นที่ได้จากส้มโอสามารถลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูที่ได้รับยาต่อออกซิเจนพิษ, ลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดส, และยังเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดยาออกจากเซลล์ นอกจากนี้จากการทดสอบฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอในเซลล์บุโพรงหลอดเลือดมนุษย์ พบว่าการให้ น้ำคั้นส้มโอควบคู่ไปกับอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 35 วัน จะช่วยลดความแก่ของเซลล์ได้ (Chularojmontri et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าการศึกษาดังกล่าวถึงคุณสมบัติต่อสุขภาพในการบริโภคส้มโอนั้นยังมีไม่มากนัก

คณะนักวิจัยจึงได้ทำการวิจัยถึงผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของส้มโอ โดยมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ต่อโรคทางระบบประสาท เช่นฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท ผลในการป้องกันและฟื้นฟูภาวะความจำเสื่อม และ ผลการต้านภาวะซึมเศร้า รวมถึงวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์และแอนโทไซยานิน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความเชื่อมโยงระหว่างปริมาณสารสำคัญต่างๆเหล่านี้และฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญโดยส้มโอที่คัดเลือกมาศึกษาคือ ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี

จากผลการศึกษาวิจัยในหลอดทดลอง (in vitro) เพื่อคัดกรองฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัด 3 ชนิด คือ สารสกัดผลส้มโอ พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ทองดี และทับทิมสยาม พบว่าสารสกัดผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แรงที่สุดทั้งใน model ABTS assay และ DPPH assay สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส และจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture model) ถึงฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และ beta amyloid ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 พันธุ์มีฤทธิ์ดีในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และจาก beta amyloid

จากการศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ของสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแบบจำลองสัตว์ทดลอง โดยใช้โมเดลศึกษา คือ Morris Water Maze สำหรับวัดผล long-term memory และ Y-maze test สำหรับวัดผล short-term memory พบว่าสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามสามารถใช้เวลาในการว่ายน้ำใน quadrant ที่เคยวางแผ่นรองไว้ ในการทดสอบ Morris water maze ของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม scopolamine นอกจากนี้สารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามยังสามารถเพิ่ม % alternation ในการทดสอบ Y-maze test ของสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ scopolamine เพียงอย่างเดียว ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่า ทั้งสารสกัดจากผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีผลป้องกันภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Scopolamine ได้ โดยมีผลทั้ง spatial short-term memory (ความจำระยะสั้น) และ spatial long term memory (ความจำระยะยาว)

ส่วนผลการศึกษาผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B พบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี และทับทิมสยาม มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ในขณะที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งนั้นไม่มีศักยภาพเพียงพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองตัว เนื่องจากว่าที่ความเข้มข้นที่ 1 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดนั้น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ได้เพียง 12.39 % และ 26.46% ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ทองดี และทับทิมสยามมาทำการทดสอบขั้นต่อไปเพื่อหาค่า IC_{50} จากการทดลองพบว่าโดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง MAO-A activity ได้ดีที่สุดคือ สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดี ด้วยค่า IC_{50} 352.16 ± 8.03 ug/mL ส่วนสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม มีค่า IC_{50} 721.20 ± 3.82 ug/mL ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ MAO-B สารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดียับยั้งได้ดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} 6.99 ± 1.13 ug/mL ส่วนสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม มีค่า IC_{50} 68.39 ± 9.42 ug/mL และเมื่อนำค่า IC_{50} ของแต่ละสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B มาคำนวณค่า Selectivity Index (SI) จะพบว่าทั้งทองดีและทับทิมสยามนั้นมีความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-B ได้ดีกว่า MAO-A โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดส้มโอพันธุ์ทองดีมีค่า selective index ต่อ MAO-B สูงเท่ากับ 50.38 และจากการทดสอบและคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือทับทิมสยาม ทองดี และขาวน้ำผึ้ง ด้วยวิธี tail suspension test และ forced swimming พบว่า เฉพาะสารสกัดส้มโอทับทิมสยามเท่านั้น ที่มีผลในการลดค่า immobility time ได้ทั้งสองแบบทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนู

กลุ่มควบคุม ส่วนสารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งนั้นไม่มีผลในการลดพฤติกรรมซึมเศร้าได้เลยจากทั้ง 2 แบบทดสอบ ดังนั้นจากการคัดกรองฤทธิ์ในการต้านซึมเศร้าเบื้องต้นของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ทองดี และขาวน้ำผึ้ง จะมีเพียงทับทิมสยามเท่านั้นที่จะถูกนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยใช้แบบจำลอง unpredictable chronic mild stress (UCMS)

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีศักยภาพในการต้านภาวะซึมเศร้าในแบบจำลอง UCMS หนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดจะมีการบริโภคน้ำตาลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-6 ซึ่งพฤติกรรมนี้จะบ่งบอกถึงภาวะ anhedonia ซึ่งเป็นพฤติกรรมซึมเศร้า แต่เมื่อได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในขนาด 500 mg/kg/day เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าหนูทดลองมีการบริโภคน้ำตาลที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดและได้รับน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว และลดความเครียดได้ใกล้เคียงกับยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน imipramine ขนาด 20 mg/kg/day นอกจากนี้ หนูที่ถูกเลี้ยงดูภายใต้สภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน จะมีค่า immobility time ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่บ่งบอกถึงภาวะสิ้นหวัง สูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P value <0.05) ในแบบทดสอบ tail suspension test และ forced swimming test และเมื่อหนูที่ได้รับความเครียดสะสมเป็นระยะเวลานาน ร่วมกับการได้รับสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ในขนาด 250 และ 500 mg/kg/day เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ จะมีค่า immobility time ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับความเครียดสะสมและได้รับน้ำกระสายยาเพียงอย่างเดียว และพบว่าสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามสามารถลดค่า immobility time ได้ไม่แตกต่างจากยาด้านซึมเศร้ามาตรฐาน Imipramine ในขนาดยา 25 mg/kg/day, i.p. โดยการลดลงของค่า immobility time นั้นไม่ได้เป็นผลมาจากการที่ยานี้ไปรบกวน locomotor activity ในหนูทดลอง ดังนั้นกลไกในการต้านภาวะซึมเศร้าของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามน่าจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแสดงออกของ BDNF mRNA ได้ทั้งในสมองส่วน hippocampus และ frontal cortex และอาจจะเกี่ยวข้องกับการที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B ได้

โดยผลการทดสอบฤทธิ์ในการปกป้องสมอง พื้นฟูความจำ และฤทธิ์ในการต้านภาวะซึมเศร้าของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ สอดคล้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารสำคัญในสารสกัดของผลส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ทองดี และ ขาวน้ำผึ้ง ที่เตรียมจากขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบ พบว่าส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม มีปริมาณสารสำคัญจำพวกฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ และ แอนโทไซยานินมากที่สุด รองลงมาคือพันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้งตามลำดับ จากการที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ไม่มีฤทธิ์ทั้งในแบบทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ และการลดภาวะซึมเศร้านั้น น่าจะเป็นผลมาจากที่สารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งนี้ มีปริมาณสารสำคัญจำพวกฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ และ แอนโทไซยานินน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับส้มโอพันธุ์ทองดีและทับทิมสยาม

จากข้อมูลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางโภชนาการมากยิ่งขึ้น ทำให้ทราบถึงคุณประโยชน์ของการบริโภคผลไม้ไทยอย่างแท้จริง โดยเฉพาะในแง่ของการป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมอันมีสาเหตุเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ หรือภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จะเป็นข้อมูลและหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อเพิ่มมูลค่าของผลไม้ไทยในการส่งออก พร้อมทั้งส่งเสริมให้

ผู้บริโภครู้ได้เห็นความสำคัญของผลไม้ชนิดนี้ โดยเฉพาะประโยชน์ในแง่โภชนะบำบัด และการช่วยป้องกันการเกิดโรคทางสมองและระบบประสาทต่างๆ

ข. กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. นำเสนอผลงานวิจัยรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6) 21st-23rd January, 2016, Pullman Raja Orchid Hotel, KhonKaen THAILAND.

Antidepressant-like effect of *Citrus maxima* fruit juice on unpredictable chronic mild stress in mice model

Juthamart Maneenet^{*a}, Chantana Boonyarat^b, Supawadee Doadee^b, Onchuma Vipatpakpaiboon^b, Orawan Monthakantirat^b, Yaowared Chulikhit^b

^aGraduate school, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002

^bFaculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002

*juthamart_pp@hotmail.com

ABSTRACT

Citrus grandis (L.) Osbeck also known as Pomelo is the largest of all Citrus, the native fruit of great economic in Thailand. The evident shown that the antioxidant potential of pomelo. In this study aimed to investigate antidepressant-like behavior in mice to unpredictable chronic mild stress (UCMS) to clarify the antidepressant-like activity of pomelo cultivar Tubtim Siam (TS). UCMS has been used a model of depression and also has a combination of a strong predictive, face and construct validity. UCMS can be reversed by antidepressant medicine. In experiment the UCMS mice were administered TS daily (250, 500 mg/kg, p.o.) or imipramine, a reference antidepressant (IMP 20 mg/kg, i.p.), 2 week after stating the UCMS procedure. We employed the sucrose preference test to analyze anhedonia-like behavior, tail suspension test and force swimming test to analyze depression-like behavior. The UCMS procedure induced anhedonia and depression-like behavior, and TS treatment, as well as IMP treatment, alleviated these symptoms. These results suggest that TS exerted antidepressant-like activity and may have a benefit in the future. The plausible mechanism should be further investigated.

2. นำเสนอผลงานวิจัยรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologists (13th APFP) Meeting “New paradigms in Pharmacology for Global Health” 1st-3rd February 2016, The Berkeley Hotel Pratunam, Bangkok, THAILAND

***In vitro* activity of pomelo CV. “Kao Numpueng” relevant to treatment of Alzheimer’s disease.**

Piangkamol Sonphueng¹, Pornthip Waiwut², Yaowared Chulikhit¹, Supawadee Doadee¹, Chantana Boonyarat^{1*}

¹*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand;* ²*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand*

** Corresponding Author*

In searching for a promising candidate for treatment of Alzheimer/dementia, the effect of the ethanol extract of pomelo CV. “Kao Numpueng” (KN) on pathological cascade of Alzheimer’s disease (AD) was investigated by *in vitro* and cell culture models. The result exhibited that the ethanol extract of KN showed antioxidant activity by both 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay with IC₅₀ values of 0.29 and 0.95 mg/mL, respectively. The result from ellman method indicated that the KN extract could not inhibit acetylcholinesterase function. In addition, for ThioflavinT assay which studies an effect on β -amyloid aggregation indicated that the KN extract at the concentration of 0.1 mg/mL was able to inhibit β -amyloid aggregation with inhibitory percentage value of 22.92. From the neuroprotection study in cell culture revealed that the ethanol extract of KN could reduce neuronal death induced by oxidative stress and β -amyloid toxicity. The overall results indicated that the KN extract possesses multimode of action involved with AD pathology cascade including antioxidant, anti-aggregation of beta amyloid, and neuroprotection against oxidative stress and beta-amyloid toxicity. Thus, the Pomelo CV. “Kao Numpueng” might be a potential candidate for further developing as drug for Alzheimer’s disease.

ค. ตารางเปรียบเทียบ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง

Output (6 เดือนที่ 3)		หมายเหตุ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ	ผลสำเร็จ(%)	
กิจกรรมที่ 1 <u>การเตรียมสารสกัดหยาบจากผลส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ทองดี และ ขาวน้ำผึ้ง</u> 1. หั่น และบด ตัวอย่าง 2. สกัดตัวอย่างด้วยด้วย 95%ethanol	100	Output ของทุกกิจกรรมเป็นไปตามแผนที่ตั้งเอาไว้
กิจกรรมที่ 2 <u>การออกฤทธิ์ของสารสกัดในการฟื้นฟูความจำ</u> 1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส 2. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากผลส้มโอในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS assay 3. ประเมินความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ประสาท neuroblastoma โดยวิธี MTT assay 4. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องจาก hydrogen peroxide 5. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid 6. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide โดยวิธี western blotting analysis 7. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องในสัตว์ทดลอง	100	
กิจกรรมที่ 3 <u>ผลของสารสกัดในการต้านภาวะซึมเศร้า</u> 1.ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์คือ ทับทิมสยาม ทองดี และขาวน้ำผึ้ง ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B 2.คัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของสารสกัดด้วยแบบทดสอบ TST และ FST 3.ศึกษาฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของสารสกัดส้มโอใน	100	

assay 4. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress อันเนื่องจาก hydrogen peroxide 5. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid 6. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide โดยวิธี western blotting analysis 7. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องในสัตว์ทดลอง <u>ผลของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ในการต้านภาวะซึมเศร้า</u> 1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B 2. คัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าของสารสกัดด้วยแบบทดสอบ TST และ FST	4. ได้ข้อมูลด้านการออกฤทธิ์ของสารสกัดตัวอย่างในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress 5. ได้ข้อมูลของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid 6. ได้ข้อมูลของสารสกัดในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide โดยวิธี western blotting analysis 7. ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดในการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่อง 1. ได้ข้อมูลเบื้องต้นผลของสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B รวมถึงค่า IC₅₀ ของสารสกัดส้มโอทับทิมสยามและทองดี ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO-A และ MAO-B 2. ได้ข้อมูลเบื้องต้นจากการคัดกรองฤทธิ์ต้านซึมเศร้าในหนูทดลองว่า ส้มโอสายพันธุ์ใดที่มีศักยภาพที่สุดในการศึกษา	100	
--	--	------------	--

3. ศึกษาฤทธิ์ด้านซึมเศร้าของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแบบจำลองภาวะเครียดอย่างอ่อนเป็นระยะเวลานาน <u>ควบคุมคุณภาพของสารสกัดในเชิงปริมาณ</u>	ขั้นตอนต่อไป 3.ได้ข้อมูลฤทธิ์ด้านซึมเศร้าของสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแบบจำลองภาวะเครียดอย่างอ่อน ทราบปริมาณสารสำคัญรวมของฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แคโรทีนอยด์และแอนโทไซยานินของสารสกัดจากผลส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ทับทิมสยาม ทองดี และ ขาวน้ำผึ้ง	100	
--	--	-----	--

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆต่อสกว.

1. ประชุมกับนักศึกษา/ผู้ช่วยวิจัย หรือนักศึกษาขอพบเพื่อหารือการทำวิจัย 9 ครั้ง
2. ตรวจแก้ผลงานวิจัยที่ทำโดยนักศึกษาหรือผู้ช่วยวิจัย 9 ครั้ง
3. ประชุมกับคณะผู้วิจัย 6 ครั้ง

ลงนาม


(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่ 31 มีนาคม 2559