เนื้อเรื่อง

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

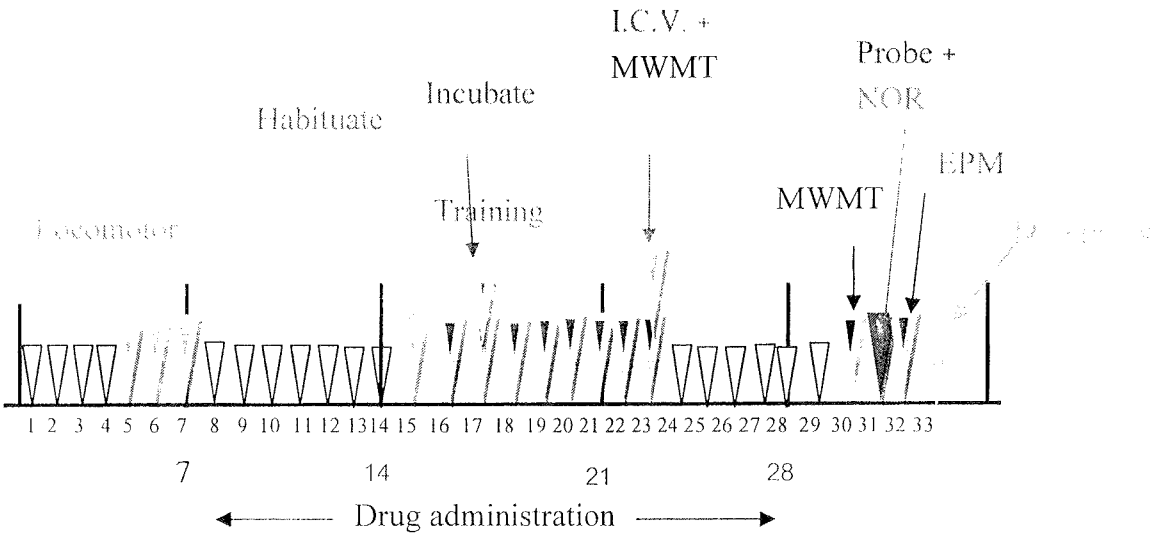
หนูถีบจักรเพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ น้ำหนัก 25-35 กรัม ถูกเลี้ยงในกรงสแตนเลส กรงละ 5 ตัว ที่อุณหภูมิ 25±2 C ซึ่งได้รับน้ำและอาหารอย่างเพียงพอ เพื่อลดภาวะเครียดของสัตว์ทดลอง ก่อนทำการทดลองสัตว์ได้พักผ่อนเป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นได้ถูกแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่ม Control จำนวน 10 ตัว
2. กลุ่ม PG จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อน Propylene glycol (PG) ทางปาก ซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารสะกัดพรมมิ
3. กลุ่ม PG-NSS จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อน PG ทางปาก และถูกฉีดด้วย 0.9% Normal saline solution ข้าไปที่ Lateral ventricle
4. กลุ่ม PG-Aβ จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อน PG ทางปาก และถูกฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ข้าไปที่ Lateral ventricle
5. กลุ่ม BA- Aβ จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อนสารสะกัดพรมมิ ขนาด 40 mg/kg ทางปากและถูกฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ข้าไปที่ Lateral ventricle
6. กลุ่ม Saponin- Aβ จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อน Saponin enriched ความเข้มข้น 30% ด้วยขนาด 6.67 mg/kg ทางปาก และถูกฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ ข้าไปที่ Lateral ventricle
7. กลุ่ม EGb - Aβ จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อนด้วยสารสะกัดแปะก๊วยขนาด 100 mg/kg ทางปาก และถูกฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ข้าไปที่ Lateral ventricle
8. กลุ่ม Aricept- Aβ จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อนทางปากด้วย Aricept ขนาด 0.2 mg/kg และถูกฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ ข้าไปที่ Lateral ventricle

ก่อนการให้ยา สัตว์ทดลองจะทำการจัดกลุ่มโดยอาศัยการตรวจความสามารถในการเคลื่อนไหว (locomotor activity test)

รายละเอียดการให้ยาแก่สัตว์ทดลองมีดังนี้คือ

1. สัตว์ทดลองได้รับยา 2 สัปดาห์ก่อน และ 1 สัปดาห์หลังการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ข้าไปที่ Lateral ventricle
2. การให้ยาสัตว์ทดลองได้รับยาโดยวิธีใส่ท่อเข้าไปในหลอดอาหาร (Feeding needle) วันละ 1 ครั้งตอนเช้าด้วยปริมาตร 200 µl



ภาพที่ 2 แสดงแผนดำเนินการวิจัย

แผนการดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองได้ทำการถูกวัดความสามารถในการเคลื่อนไหว (Locomotor test) หลังจากนั้นจะทำการวัด MWMT หลังจากการฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าไปใน Lateral ventricle หลังจากนั้น 1 วันจากการทำ MWMT สัตว์ทดลองจะถูกทำการทดสอบ novel recognition (NOR) test และ elevated plus maze (EPM) test ตามลำดับ แล้วนั้นสัตว์ทดลองจะถูกฆ่าโดยการดึงกระดูกคอ สมองของสัตว์ถูกฆ่าแล้วนำมาวัดระดับของ lipid peroxidation และย้อมสีของเซลล์ประสาทต่อไป

การเตรียมสารสะกัดพรรมิ

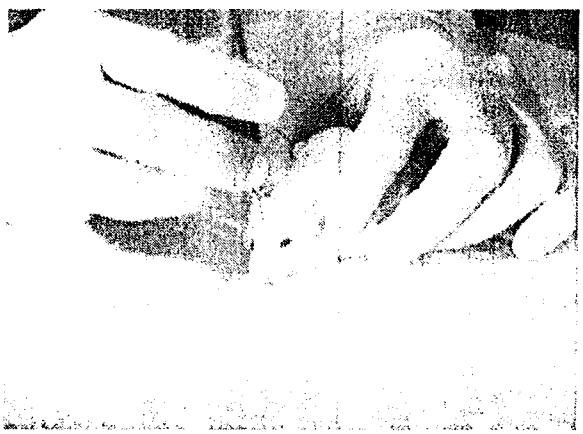
ลำต้นของพรมมิถูกตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆแล้วนำไปอบให้แห้ง จากนั้นนำไปแช่ใน ethanol ความเข้มข้น 95%นาน 8 ชั่วโมง แล้วนำไปอบแห้งอีกครั้ง หลังจากนั้นทำการระเหย ethanol ออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ทำให้ได้สารสกัดพรมมิที่มีความเข้มข้น 5% และ 30 % ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดพรมมิที่ได้นั้นมีส่วนผสมของ Saponin เป็นหลักประกอบด้วย bacoside A3, bacopaside II, bacopa saponin X, bacopasaponin C and bacopaside I. สุดท้ายทำการทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดดังกล่าวด้วยวิธี HPLC (Deepak et al., 2005; Hou et al., 2002; Phrompittayarata et al., 2007)

การเตรียมเบต้าอะไมลอยด์

ละลายเบต้าอะไมลอยด์ ด้วย 0.9% Normal saline ด้วยความเข้มข้น 1 mg/ml หลังจากนั้นทำการแบ่งออกเป็น 5 ส่วนเท่าๆกัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนการนำมาฉีดเข้า Lateral ventricle เบต้าอะไมลอยด์ถูกบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาติดต่อกัน 4 วัน และถูกส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์เพื่อให้แน่ใจว่า เบต้าอะไมลอยด์นั้นเป็นพิษต่อเซลล์ (globular form)

การฉีด A_{25-35} **peptides เข้าไปใน** Lateral ventricle

สัตว์ทดลองจะถูกทำให้สลบด้วย Isoflurane และได้รับ Beta-amyloid peptide ($A\beta_{25-35}$) โดยฉีดผ่านเข้าโพรงสมอง (Intraventricular injection) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมหรือการตายของเซลล์ประสาท โดยอ้างอิงตำแหน่งการฉีดจาก 1 mm ห่างจาก Mid line ตรงระดับจุดกึ่งกลางระหว่างตากับหูของสัตว์ทดลอง และลึก 2.0 มิลลิเมตร จาก Dura mater และทำการฉีดในปริมาณ 10 nmol/10 μl ภายในระยะเวลา 30 วินาที หลังจากฉีดแล้วสัตว์ทดลองต้องกลับมามีอาการปกติภายใน 1 นาที



ภาพที่ 3 แสดงการฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าไปใน Lateral ventricle

การวัดความจำเกี่ยวกับสถานที่ ใน Morris water maze test (MWMT)

สัตว์ทดลองจะถูกนำมาทดสอบการวัดความจำเกี่ยวกับสถานที่ หลังการได้รับ Aβ ยา และสารสกัดสมุนไพร โดยจัดทำอ่างที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 110 เซนติเมตร ที่แบ่งออกเป็น 4 ส่วน และมีแท่น (Hidden platform) เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ฝังอยู่ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ 1 เซนติเมตร และให้สัตว์ทดลองว่ายน้ำในน้ำแป้งขุ่นที่มีความลึก 13 เซนติเมตร สัตว์ทดลองจะถูกปล่อยลงที่จุดกึ่งกลางของขอบอ่าง เป็นเวลา 60 วินาทีและจับเวลาในการว่ายน้ำของสัตว์ทดลองที่ไปยืนค้างบน Hidden platform เป็นเวลา 10 วินาที แล้วจึงนำมาพัก 5 นาทีและทำการทดลองซ้ำโดยการปล่อยสัตว์ทดลองลงในตำแหน่งจุดกึ่งกลางของขอบอ่างอีก 2 ส่วน ปฏิบัติเช่นนี้เป็นเวลา 7 วันติดต่อกันเพื่อให้สัตว์จดจำแท่น Platform หลังจากสัตว์ทดลองได้รับ Aβ แล้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและ 7 วัน สัตว์ทดลองจะถูกนำมา

ทดสอบการวัดความจำเกี่ยวกับสถานที่อีกครั้งโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้างต้น และบันทึกระยะเวลาที่สัตว์ทดลองใช้ในการว่ายน้ำหาแท่น (Escape latency) สัตว์ทดลองที่ใช้เวลาในการว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำได้สั้นถือว่ามีความสามารถในการจำสถานที่ได้มากกว่าตัวที่ใช้เวลามนานกว่า และนำผลที่ได้นั้นนำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

The Novel Object Recognition (NOR) test

เป็นการทดสอบความจำที่ไม่ใช่ความจำเกี่ยวกับสถานที่ของสัตว์ทดลอง อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองนั้นประกอบด้วยกล่องพลาสติกขนาด 37x51x20 cm^3 และวัตถุจำนวน 3 ชิ้นที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ได้แก่ รถเซรามิคสีแดง แก้วทรงสี่เหลี่ยมสีฟ้าและขวดสีชา ก่อนทำการทดสอบปล่อยให้สัตว์ทดลองอยู่ในกล่องทดสอบเพื่อปรับสภาพความเคยชินเป็นเวลา 10 นาที การทดสอบเริ่มขึ้นโดยวางวัสดุ 2 ชิ้นคือ รถเซรามิคสีแดงและแก้วทรงสี่เหลี่ยมสีฟ้าที่กลางกล่องและให้วัตถุทั้งสองห่างกัน 15 cm หลังจากนั้นทำการปล่อยสัตว์ทดลองลงตรงกลางของวัตถุทั้งสอง ทำการจับเวลาที่สัตว์ทดลองเอาจมูก เท้า มาสัมผัสกับวัตุทั้งสองชนิดที่ระยะน้อยกว่า 1 cm เป็นเวลา 5 นาที แล้วบันทึกเวลาเป็น T_a และT_b เพื่อนำมาคำนวณเป็นค่าร้อยละความชอบของวัตถุ (% Preference index) = $[(T_a \times 1000)/ (T_a+T_b)]$ เสร็จแล้วนำเอาแก้วทรงสี่เหลี่ยมสีฟ้าออกแล้วนำเอาขวดสีชาเข้าไปแทนที่ หลังจากนั้นนำสัตว์ปล่อยลงตรงกลางของวัตถุทั้งสองแล้วทำการจับเวลาเช่นเดียวกันเป็น T_a และT_c แล้วคำนวณหาค่าร้อยละการจำวัตถุสิ่งใหม่ (% Recognition index) = $[(T_c \times 1000)/ (T_a+T_c)]$ และนำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

Elevated plus-maze (EPM) test

เป็นการทดสอบภาวะการวิตกกังวลของสัตย์ทดลอง ซึ่งอาศัยพฤติกรรมธรรมชาติของสัตว์ทดลอง โดยสัตว์ทดลองปกติจะมีนิสัยอยากรู้อยากเห็น ส่วนสัตว์ทดลองที่มีอาการวิตกกังวลมักชอบที่จะอยู่ในที่มืดและกลัวความสูง อุปกรณ์ที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย Open arms ขนาด 25 x 5 cm และมีผนังสูง 0.5 cm จำนวน 2 ชิ้นวางตั้งฉากกัน และ closed arms ขนาด 25 x 5 cm และมีผนังสูง 16 cm จำนวน 2 ชิ้นวางตั้งฉากเช่นกันกันตรงกลางของ Arm ทั้งสองนั้นเป็น Center area ที่มีขนาด 5 x 5 cm อุปกรณ์นี้วางอยู่บนขาตั้งที่มีความสูง 50 cm และวางไว้ในอ่าง Morris water maze เพื่อป้องกันไม่ให้สัตว์ทดลองหนีจากการทดสอบ วิธีการทดสอบทำได้โดยการปล่อยสัตว์ทดลองวางไว้ตรง Center area ของอุปกรณ์และให้สัตว์ทดลองเคลื่อนไหวโดยอิสระหลังจากนั้นทำการบันทึกภาพวีดีโอและจับเวลาที่สัตว์ทดลองเข้าไปใน Open arms และ closed arms เป็นเวลา 5 นาที และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่ม

การเตรียมเนื้อสมองในการวัดระดับของ lipid peroxidation

หลังจากที่สัตว์ทดลองถูกฆ่าแล้ว สมองส่วน hippocampus และ cortex ได้ถูกผ่าและถูกนำมาบดละเอียด Homogenization แล้วนำมาผสมกับสารละลายที่มีส่วนผสมของ 1 M phosphate buffer (pH

7.4) และ 1% Triton-X 100 ด้วยอัตราส่วนของเนื้อสมองและสารละลายดังกล่าวเท่ากับ 1:10 (w/v) แล้วนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์หาระดับ Lipid peroxidation

การวัดระดับของ lipid peroxidation

นำเนื้อเยื่อสมองที่ถูกบดโดยละเอียด และ standard (1,1',3,3' tetramethoxy propane : TMP) จำนวน 100 µl หลังจากนั้นเติม 0.1% sodiumdodesyl sulphate (SDS) ลงไปจำนวน 200 µl ตามด้วย 20% acetic acid (pH 3.5) จำนวน 1.5 ml และ 0.81% TBAจำนวน 1.5 ml จากนั้นทำการต้มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 60 min แล้วทำให้เย็นโดยการผ่านด้วยน้ำ tap water เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifugation) ที่ความเร็ว 2,500 g ภายใน 20 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์หา Lipid peroxidaiton โดยทำการวัดระดับ TBA-RS ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ระดับของ Lipid peroxidation นั้นแสดงค่า µmol MDA ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Histological procedure

สมองถูกเตรียมตามวิธี Tissue processing โดยผ่าน Fixative, Ethanol และ Clearing reagent ก่อนถูกกำซาบในพาราฟิน จากนั้นเนื้อเยื่อถูกนำไปฝังในพาราฟิน และถูกตัดที่ความหนาประมาณ 5 ไมโครเมตร เพื่อทำการย้อมเซลล์ประสาทด้วยวิธี H&E เพื่อดูการตายของเซลล์ประสาทถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์

วิธีการย้อมเซลล์ประสาทด้วยวิธี H&E

นำเนื้อเยื่อของสมองที่ถูกฝังในพาราฟินและถูกตัดที่ความหนา 5 ไมโครเมตร มาทำการจุ่มในโถที่มีสารเคมีต่างๆตามเวลาดังนี้

โถที่	สารเคมี	เวลา (นาที)
1	Xylene	5
2	Xylene	5
3	100% Alcohol	3
4	100% Alcohol	3
5	95% Alcohol	3
6	95% Alcohol	3
7	Tap water	5
8	Haematoxylene	5
9	Tap water	10
10	Lithium carbonate	5 dips

11	Tap water	1
12	95% Alcohol	1
13	Eosin	10 dips
14	95% Alcohol	5 dips
15	95% Alcohol	5 dips
16	100% Alcohol	5 dips
17	100% Alcohol	5 dips
18	Xylene	5
19	Xylene	5
20	Permount	

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

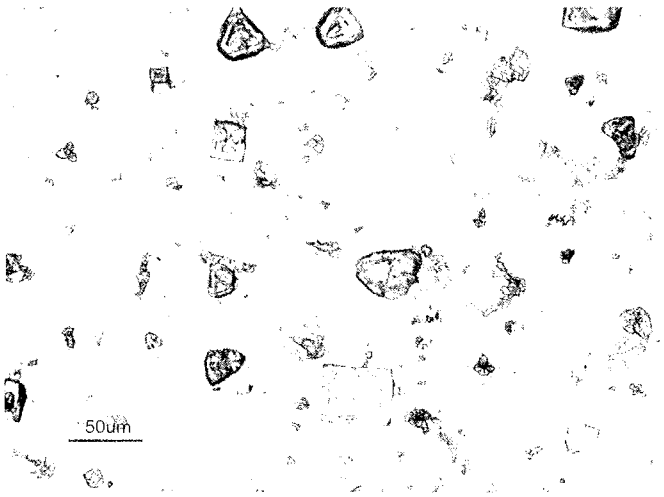
mean±S.E.M., ANOVA (LSD) test โดยตั้งค่านัยสำคัญที่ค่า p Value < 0.05

ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

ผลของสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญของพรมมิต่อการเสื่อมของเซลล์ประสาท และความจำบกพร่องที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์

ผลการเตรียมเตรียมเบต้าอะไมลอยด์

จากการบ่มเบต้าอะไมลอยด์ ในWater bath ที่อุณหภูมิ 37 °C และนำเบต้าอะไมลอยด์ไปส่องดูที่กล้องจุลทัศน์พบว่าเบต้าอะไมลอยด์นั้นได้เกาะกลุ่มกันเป็นชนิด Globular form ซึ่งยืนยันได้ว่า เบต้าอะไมลอยด์นั้นสามารถเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทได้หลังจากที่เบต้าอะไมลอยด์ที่พร้อมทำการฉีดเข้าไปใน Lateral ventricle ของสัตว์ทดลอง

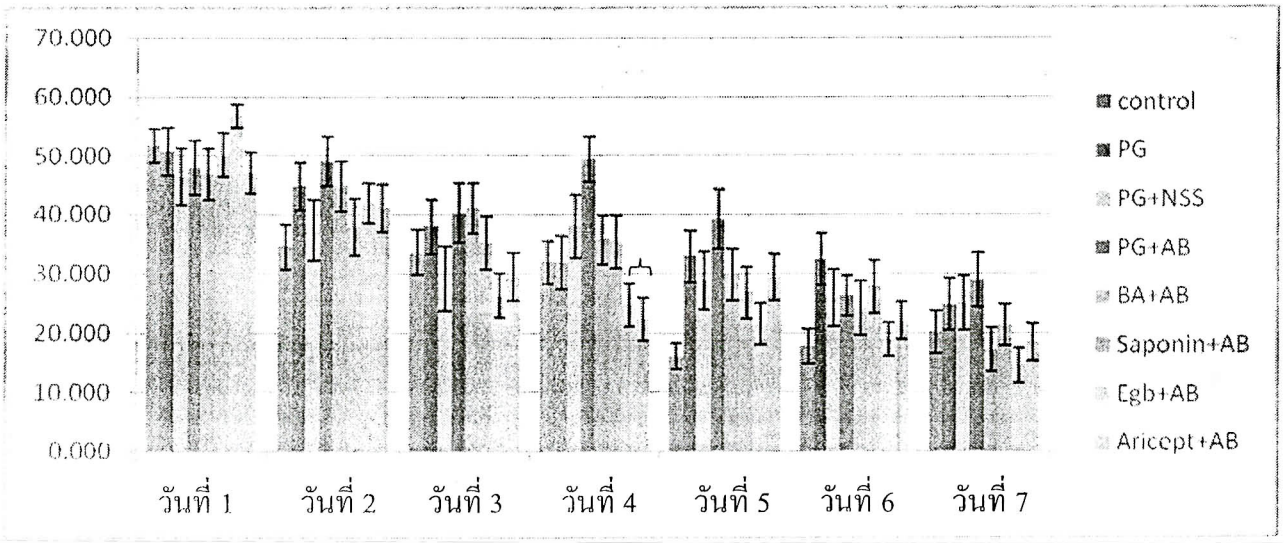


ภาพที่ 4 แสดงการเกาะกลุ่มกันของ เบต้าอะไมลอยด์ ด้วยกำลังขยาย 4x

ผลของการวัดความจำเกี่ยวกับสถานที่ ใน Morris water maze test

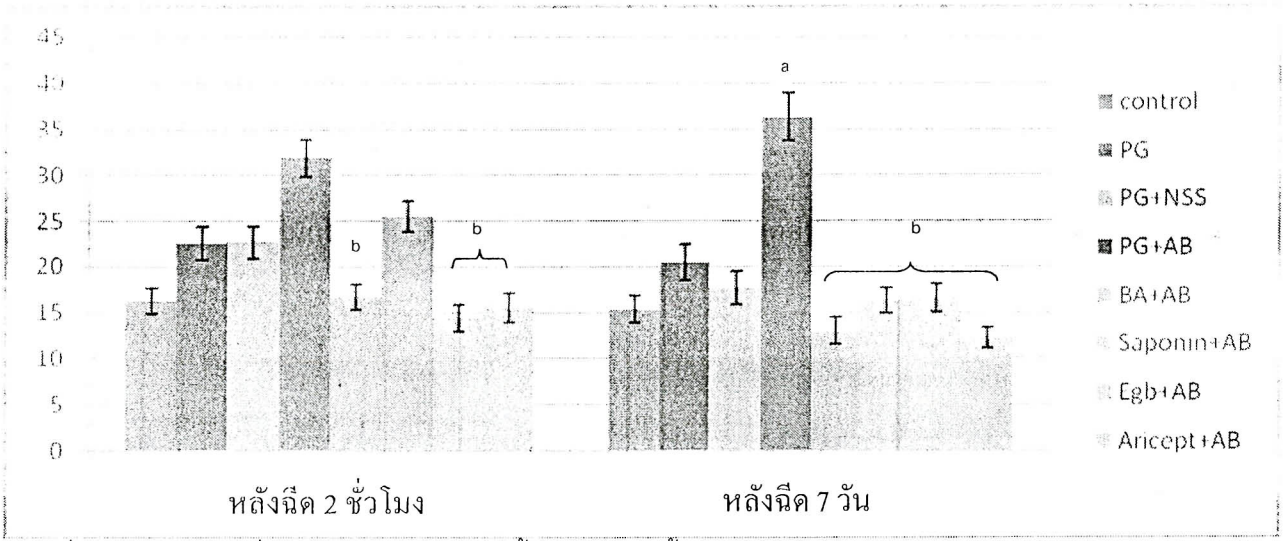
สัตว์ทดลองที่ได้รับการฝึกความจำเกี่ยวกับสถานที่เป็นเวลาทั้งสิ้น 7 วัน โดยภาพรวมพบว่าตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 นั้นสัตว์ทดลองของทุกกลุ่มมีความสามารถว่ายน้ำหาแท่นได้น้ำโดยใช้เวลาลดลงตามลำดับดังแสดง

ผลการฝึก MWMT ที่ภาพข้างด้านล่างนี้



ภาพที่ 5 แสดงกราฟการฝึกสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี MWMT เป็นเวลา 7 วัน

หลังจากการฝึกสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี MWMT แล้วสัตว์ทดลองได้ถูกทำให้เซลล์ประสาทเสื่อมด้วยการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ เข้าทาง Lateral ventricle จากนั้นสัตว์ทดลองได้ถูกนำไปทดสอบ MWMT หลังจากที่สัตว์ทดลองได้รับการฉีด เบต้าอะไมลอยด์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและ 7 วันตามลำดับ เพื่อดูผลความสามารถในการจำของสัตว์ทดลองที่เกิดจากการเสื่อมของเซลล์ประสาทในระยะสั้นและระยะยาว และผลที่ได้ แสดงไว้ในภาพด้านล่าง



ภาพที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของเวลาในการว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำ (mean ± S.E.M) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี MWMT (a= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเบต้าอะไมลอยด์)

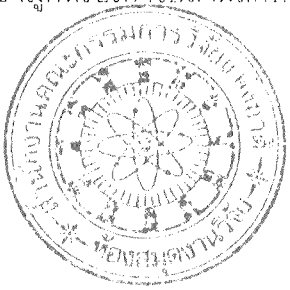
จากภาพด้านบนพบว่าหลังการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ที่เวลา 2 ชั่วโมงนั้นพบว่ากลุ่ม Control PG และ PG+NSS ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้เหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์ประสาทนั้นมีใช้เวลาในการว่ายน้ำหา

แท่นได้น้ำเท่ากับ 16.31± 2.86 22.59 ±3.59 และ 22.67± 3.47 วินาที ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า สารละลาย PGที่สัตว์ทดลองกิน และ การฉีด NSS เข้าไปใน Lateral ventricle นั้นไม่มีผลต่อการจำและว่ายน้ำหาแท่นได้น้ำเลย ในขณะที่กลุ่มสัตว์ทดลองที่รับเบต้าอะไมลอยด์ คือกลุ่ม PG+AB นั้นต้องใช้เวลาในการว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำนานที่สุด 31.86± 4.09 วินาที แสดงให้เห็นว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มนี้ไม่สามารถจดจำแท่นได้น้ำได้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่เซลล์ประสาทได้ถูกทำลายจากการฉีด เบต้าอะไมลอยด์ และเมื่อสังเกตุไปที่กลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยา หรือสารสมุนไพรควบคู่ไปกับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์นั้น พบว่า กลุ่มของสัตว์ทดลองที่ได้รับ พรมมิ แปะก๊วย และ Aricept นั้น สัตว์ทดลองสามารถว่ายน้ำหาแท่นได้เป็นเวลาเท่ากับ 16.70± 2.693 14.44± 2.931 และ 15.45± 3.237 วินาที ตามลำดับ ซึ่งเป็นเวลาที่สั้นกว่าของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+ABอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าสัตว์ทดลองยังสามารถจดจำแท่นได้น้ำได้ดีทั้งๆที่ได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ ซึ่งผลที่ได้นั้นใกล้เคียงกับผลของกลุ่ม Control อีกด้วย แสดงให้เห็นว่าพรมมิ แปะก๊วย และ Aricept นั้นสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทได้

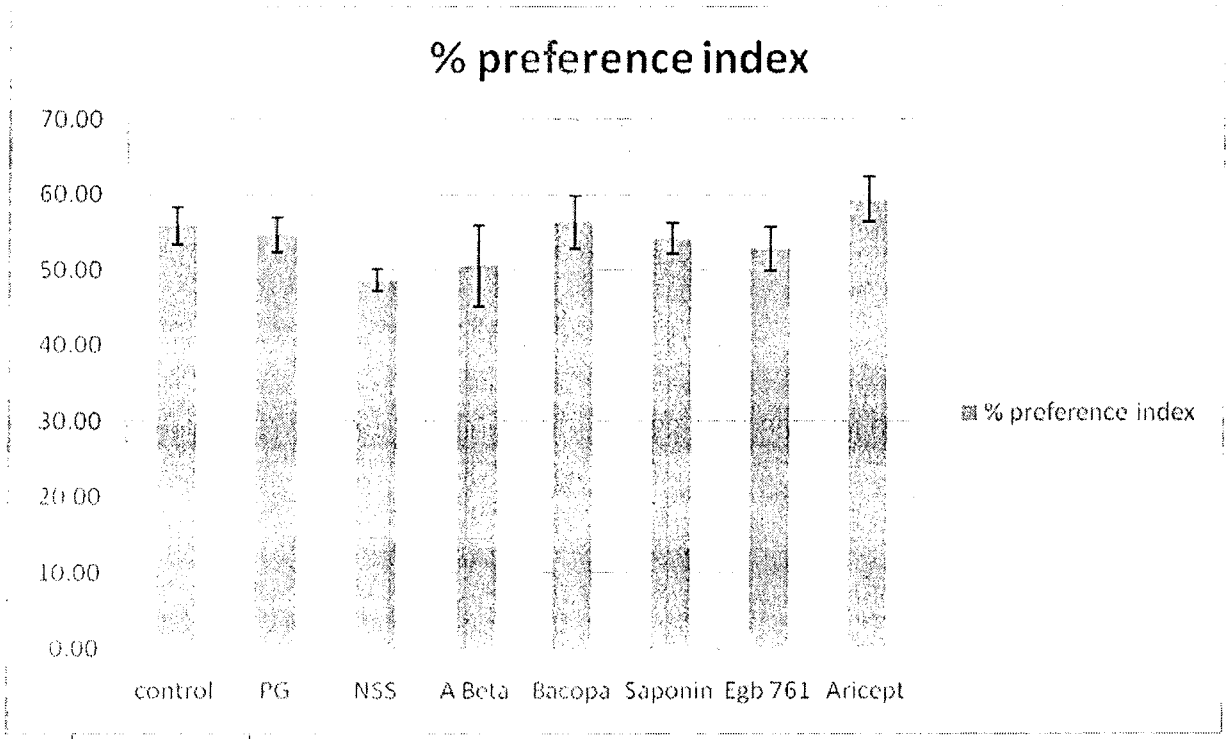
ผลของการทดสอบ MWMT หลังการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ในวันที่ 7 พบว่าหนูกลุ่ม Control PG และ PG+NSS ใช้เวลาในการว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำเท่ากับ 15.33±2.964 20.44±3.891และ 17.71±3.625 วินาที ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างของใช้เวลาในการว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำเช่นเดียวกันกับผลของ MWMT หลังการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ 2 ชั่วโมง นอกจากนี้แล้วยังพบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+AB ยังใช้เวลาในการว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำนานที่สุด 36.24± 5.151 วินาทีเช่นเดิม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของ PG+NSS นั้นพบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$ ในขณะที่สัตว์ทดลองที่ได้รับสมุนไพรและยาได้แก่ พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้น สัตว์ทดลองสามารถว่ายน้ำหาแท่นได้เป็นเวลาเท่ากับ 12.96± 2.994 16.26± 2.757 16.56± 3.042 และ 12.24± 2.126 วินาที ตามลำดับ ซึ่งเป็นเวลาที่ใกล้เคียงกันกับกลุ่ม Control PG และ PG+NSS (15.33± 2.964 20.44± 3.891 และ 17.71± 3.625 วินาที) และเมื่อเปรียบเทียบเวลาในการว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำของสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ใหยาหรือสมุนไพรทั้ง 3 กลุ่มนี้ กับเวลาในการว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+AB นั้นพบว่าหนูของทั้ง 3 กลุ่มนี้สามารถว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำได้น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$

ผลการทดสอบ Object recognition task

ผลของเวลาที่สัตว์ทดลองใช้จมูกหรือเท้าไปสำผัสกับวัตถุ 2 ชนิดได้แสดงไว้ดังภาพด้านล่างนี้

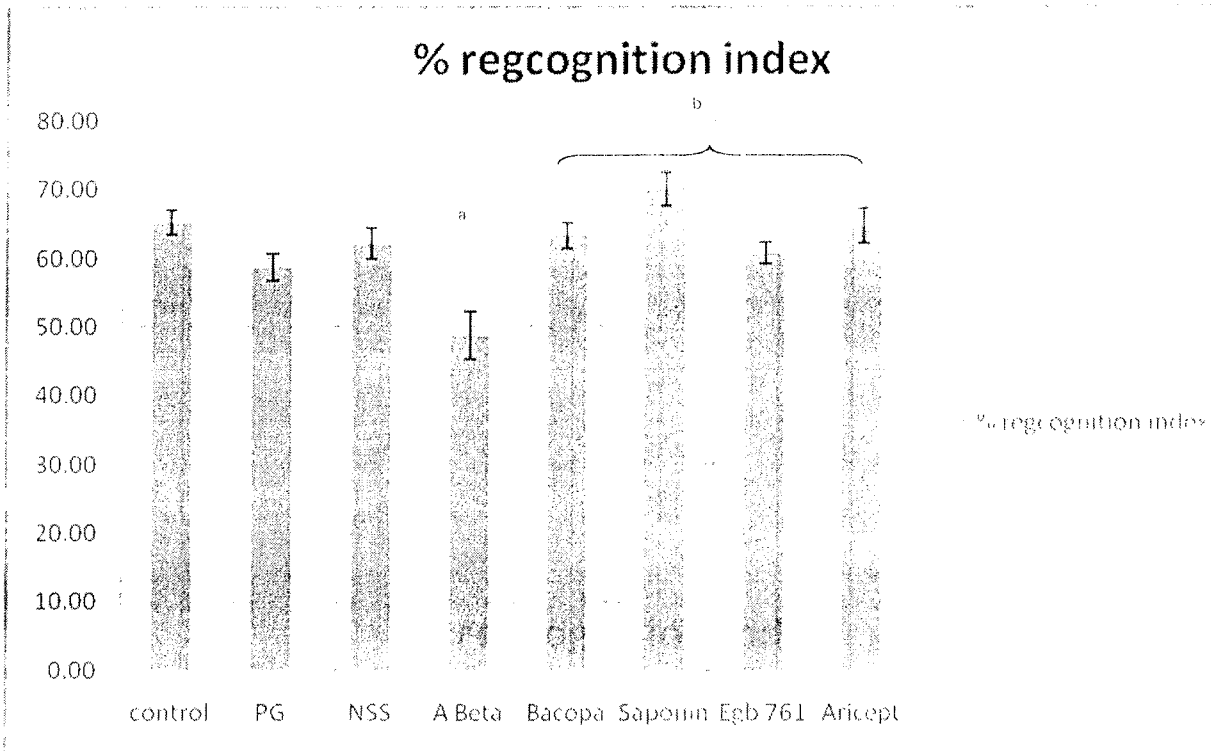


สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 10 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน 244867
เลขเรียกหนังสือ



ภาพที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของ % preference index (mean ± S.E.M) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี NOR (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

จากภาพด้านบนนั้นพบว่า % Preference index ของสัตว์ทดลองของกลุ่ม Control PG PG+NSS พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept มีค่าเท่ากับ 22.27±1.85 54.69 ±1.95 48.63 ±2.23 50. 06±3.43 56.36 ± 1.79 54.16± 2.46 52.90±1.58 และ 59.43± 2.58 ตามลำดับ ซึ่ง % Preference index ของสัตว์ทดลองทุกกลุ่มนั้นไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่าสัตว์ทดลองของทุกกลุ่มนั้นมีความชื่นชอบกับวัตุทั้งสองสิ่งนี้พอๆกัน และเมื่อทำการเปลี่ยนวัตุชิ้นใหม่เข้าไปแทนที่วัตถุเก่าพบว่าเวลาของการสนใจในวัตุสิ่งใหม่ของสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มนั้นมีความแตกต่างกันดังแสดงไว้ในภาพด้านล่างนี้

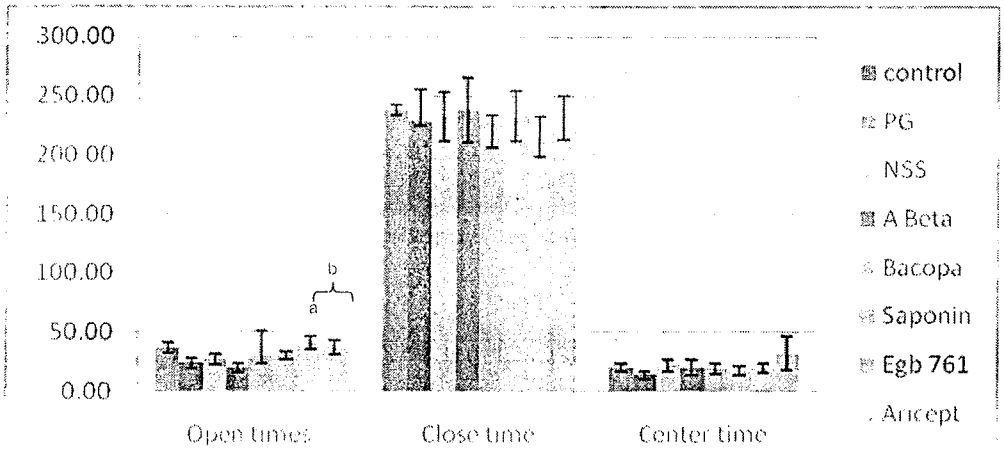


ภาพที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยของ % recognition index (mean ± S.E.M) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี NOR (a – p ≤ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b– p ≤ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

จากภาพด้านบนพบว่าเวลาที่สัตว์ทดลองสนใจในวัตถุสิ่งใหม่ของกลุ่ม Control PG และ NSS นั้นมีค่า % Recognition index เท่ากับ 65.21± 2.46 58.65 ± 2.27และ 62.09 ± 1.44 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่สัตว์ทดลองที่ได้รับการฉีดเบต้าอะไมลอยด์กลุ่ม PG+AB นั้นให้ความสนใจกับวัตถุสิ่งใหม่น้อยลง (% Recognition index = 48.77± 5.41) และเมื่อเปรียบเทียบ % Recognition index ของสัตว์ทดลองกลุ่ม PG+AB กับกลุ่ม NSS แล้วพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05) แสดงให้เราทราบว่าสัตว์ทดลองกลุ่ม PG+AB นั้นไม่สามารถจดจำวัตถุเดิมๆได้ ซึ่งผลที่ได้นั้นแตกต่างกันกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยา หรือ สมุนไพร คือกลุ่มของ พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept ควบคู่กับการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ นั้นได้ให้ความสนใจต่อวัตถุสิ่งใหม่ โดยสามารถหาค่า % Recognition index ได้เท่ากับ 63.27± 3.46 70.02±2.04 60.72±2.90 และ 64.68± 2.93 ตามลำดับ และเมื่อนำผลที่ได้ของกลุ่มดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับผลที่ได้ของกลุ่ม PG+AB นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05)

ผลการทดสอบ EPM

เวลาที่สัตว์ทดลองเคลื่อนไหวใน Open และ Close arm ได้แสดงไว้ในภาพด้านล่างนี้



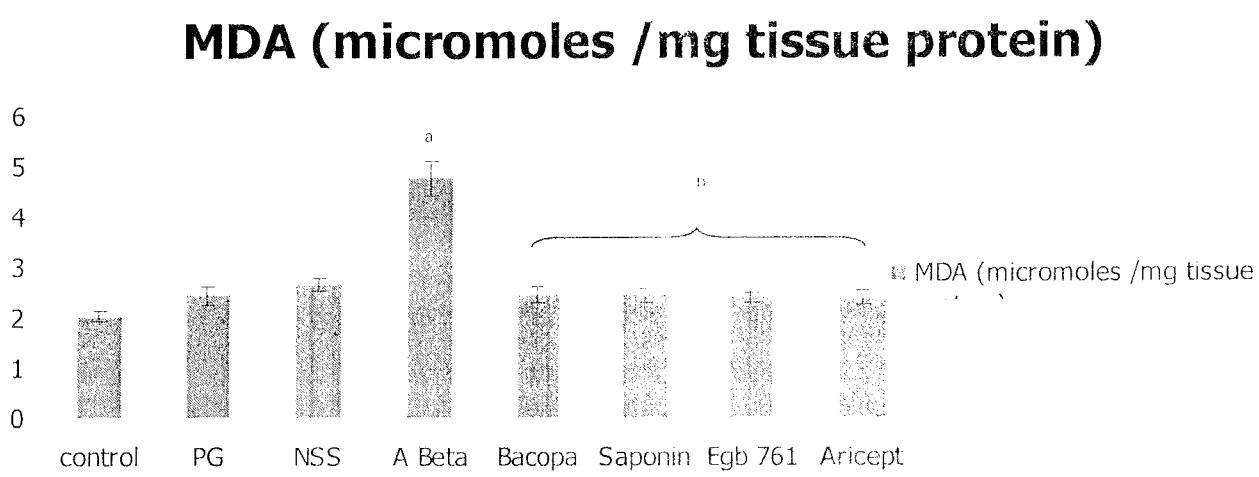
ภาพที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยของเวลาที่สัตว์ทดลองเข้าไปใน Open และ Close arm (mean ± S.E.M) (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

เวลาที่อยู่ใน Close arm ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG NSS PG+AB พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept มีค่าเท่ากับ 237.81±4.33 228.87±26.40 232.18±20.62 237.98 ±27.13 226.59±20.30 232.85± 18.68 231.50±17.06 และ 215.42±21.279 วินาที ตามลำดับ

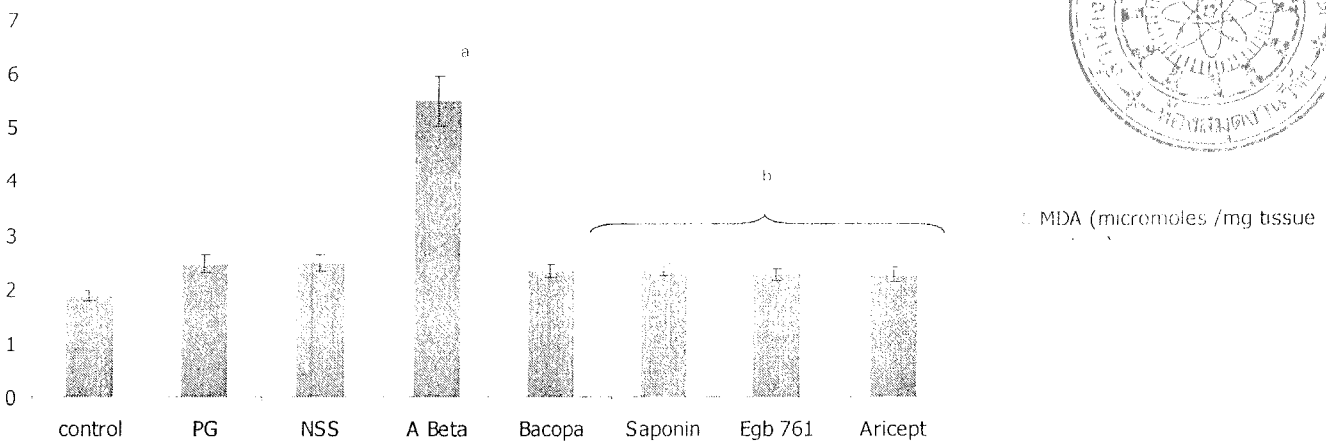
เวลาที่อยู่ใน Open arm ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG NSS PG+AB พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept มีค่าเท่ากับ 37.17±4.56 24.70±3.75 27.29±3.95 20.45±4.04 31.02±7.41 30.86± 3.46 41.68±5.716และ 37.73±6.13วินาที ตามลำดับ

ผลการวัดระดับของ Lipid peroxidation

ระดับของ Lipid peroxidation ของสมองส่วน Cortex และ Hippocampus ของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มได้แสดงไว้ในภาพด้านล่างนี้



ภาพที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ MDA µmole/mg tissue proteins ในสมองส่วน Cortex (mean ± S.E.) (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



ภาพที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ MDA µmole/mg tissue proteins ในสมองส่วน Hippocampus (mean ± S.E.) (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

ระดับ MDA ของสมองส่วน Cortex ของสัตว์ทดลองในกลุ่ม Control PG และ NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 2.02± 0.10 2.43± 0.17และ 2.65± 0.13 µmole/mg tissue proteins ตามลำดับ ในขณะที่ ระดับ MDA ของสมองส่วน Cortex ของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+AB มีค่าเท่ากับ 4.75±0.33 µmole/mg tissue proteins ซึ่งมีค่า มากกว่าของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ PG+NSS (2.65 ± 0.12 µmole/mg tissue proteins) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ระดับ MDA ของสมองส่วน Hippocampus ของสัตว์ทดลองในกลุ่ม Control PG และ NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 1.87± 0.08 2.45± 0.17และ 2.47± 0.15 µmole/mg tissue proteins ตามลำดับ และ ระดับ MDA ของสมองส่วน Hippocampus ของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+AB มีค่าเท่ากับ 5.48±0.48 µmole/mg tissue proteins ซึ่งมีค่ามากกว่าของสัตว์ทดลองกลุ่มของ PG+NSS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกับของสมองส่วน Cortex

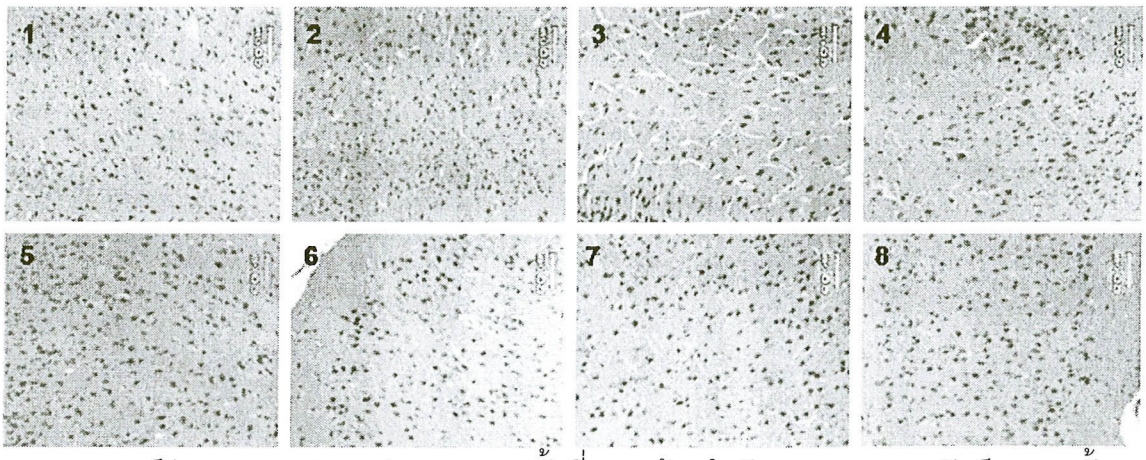
จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้เราทราบว่าการฉีดเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle สามารถทำให้ ระดับ MDA ในสมองเพิ่มขึ้นได้โดยเฉพาะสมองส่วน Cortex และ Hippocampus ในขณะที่สัตว์ทดลองได้รับยา หรือ สมุนไพรควบคู่กับการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ นั้น ระดับของ MDA ในสมองส่วน Cortex ของสัตว์ทดลองในกลุ่ม พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept มีค่าเท่ากับ 2.45 ±0.17 2.43 ± 0.14 2.38± 0.10 และ2.38± 0.13 µmole/mg tissue proteins ตามลำดับ ส่วน ระดับของ MDA ในสมองส่วน Hippocampus ของสัตว์ทดลองในกลุ่ม พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept มีค่าระดับของ MDA เท่ากับ 2.33±0.123 2.3± 0.10 2.25± 0.10และ 2.24±0.14 µmole/mg tissue proteins ตามลำดับ เช่นกัน ระดับของ MDA ที่สมองทั้งส่วนของ Cortex และ hippocampus ของสัตว์ทดลองที่ได้รับพรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept ควบคู่กับการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ นั้นมีค่าที่น้อยกว่าของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+AB (4.75± 0.33 5.48± 0.48 µmole/mg tissue proteins) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) อีกด้วย

ผลของพรมมิต่อการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทด้วยวิธี H&E

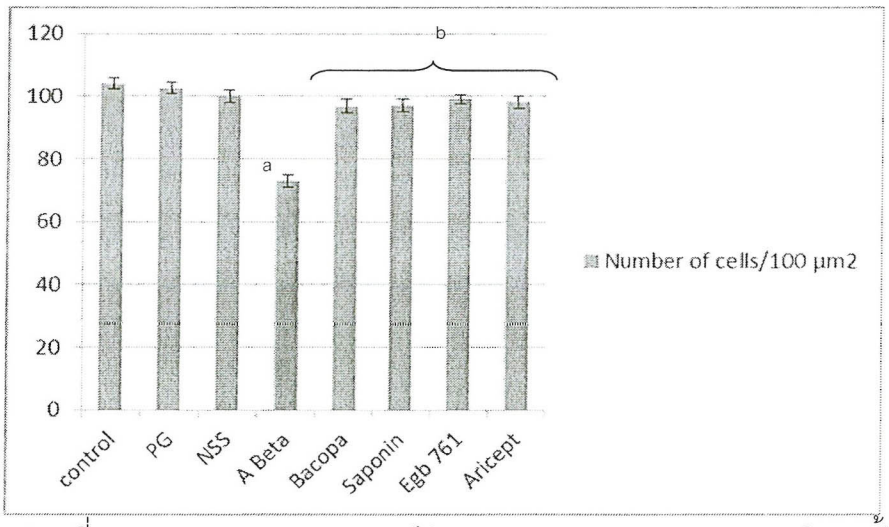
การวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการย้อมเซลล์ประสาทด้วยวิธี H&E และได้ทำการนับเซลล์ประสาทที่สมบูรณ์นั้นต้องสามารถเห็นลักษณะของเซลล์ Nuclease และNucleolusที่สมบูรณ์ ซึ่งเซลล์ประสาทที่นับได้นั้นได้ถูกคำนวณเป็นร้อยละจำนวนเซลล์เพื่อเทียบกับกลุ่มNSS

เซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 (External granular/pyramidal layer) ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ104.04±1.85 102.60± 1.77และ 100± 2.01 cells/100µm^2 ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5(nxternal granular/pyramidal layer) มีค่า เท่ากับ 101.99±2.64 100.70±1.52 และ 99.76±1.71 cells/100µm^2 ตามลำดับ และชั้นที่ 6 (Poly morphic layer) มีค่า เท่ากับ 100.35±2.19 101.19±2.41 และ 100.66±2.22 cells/100µm^2 ตามลำดับ เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีดด้วยเบต้าคะไมลคยด์เข้าไปใน Lateral ventricle จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 4/5 และ ชั้นที่ 6 ของสัตว์ทดลอง กลุ่มPG+AB นี้มีค่า เท่ากับ 72.93±1.96 75.05±3.49 และ 75.50±2.39 cells/100µm^2 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ของสัตว์ทดลองที่ได้รับการฉีดด้วย เบต้าคะไมลคยด์ นั้นมีจำนวนที่น้อยกว่า กลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+NSS นั้นพบว่าจำนวนเซลล์

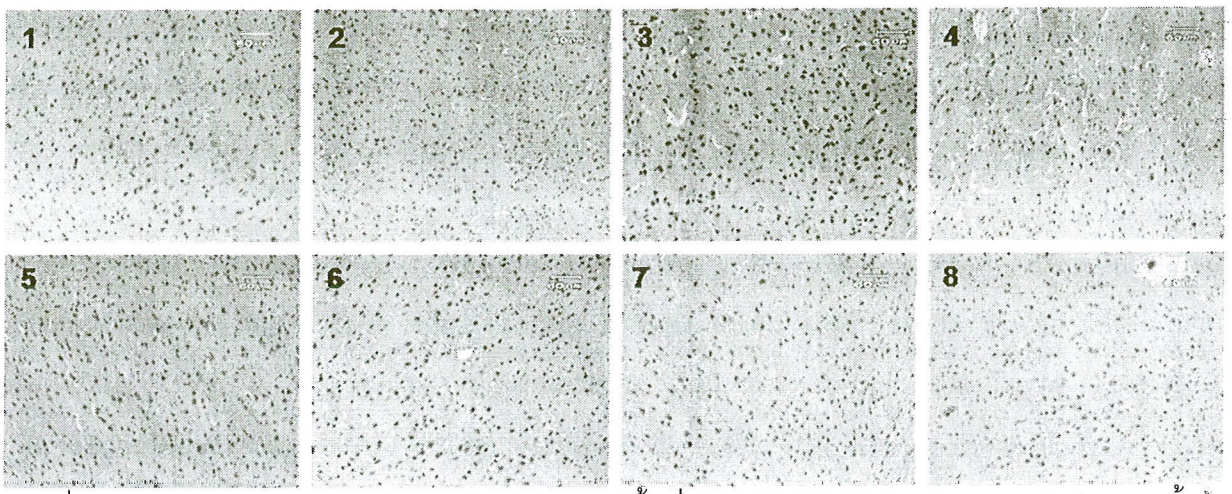
ประสาทของทุกชั้นใน Cortex มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาจำนวนของแซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองที่ได้รับยา หรือสมุนไพรที่ควบคู่ไปกับการฉีดด้วย เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle ได้แก่ สัตว์ทดลองในกลุ่ม พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้นพบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 ของสัตว์ทดลอง นั้นมีค่า เท่ากับ 96.86±2.16 97.11±2.02 99.12 ±1.47 และ98.07±1.89 cells/100μm^2 ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5 มีค่า เท่ากับ 97.32±2.52 95.07±2.48 96.42±2.53และ97.45±2.51 cells/100μm^2 ตามลำดับ และชั้นที่ 6 มีค่า เท่ากับ 97.62±3.32 96.05±2.83 95.72±2.80 และ 95.94±2.39 cells/100μm^2 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับยา หรือสมุนไพรเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+AB แล้วพบว่าจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับยา หรือสมุนไพรนั้นมีเซลล์ประสาทที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้เราทราบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับ พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้นสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเบต้าอะไมลอยด์ได้



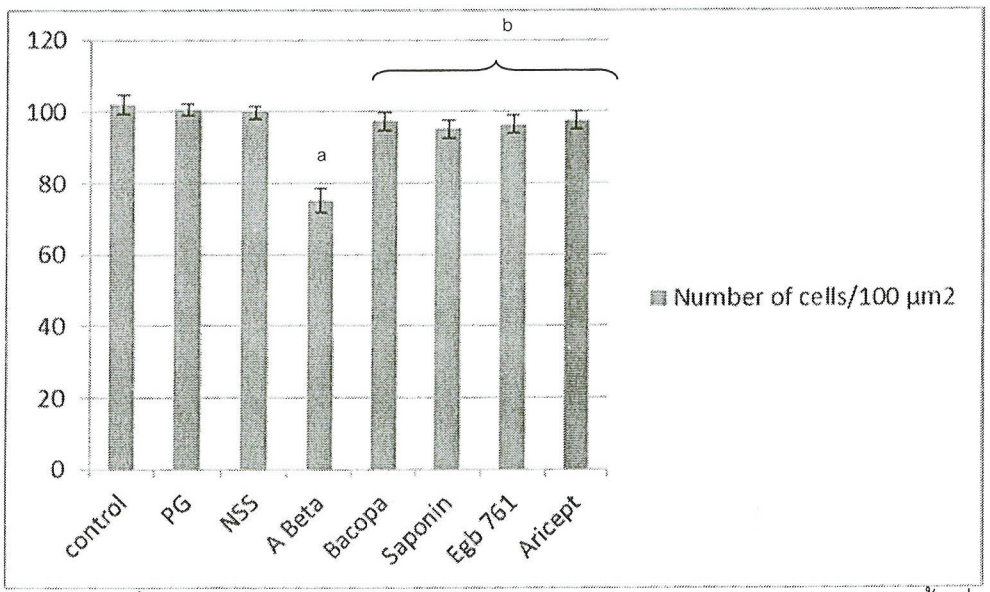
ภาพที่ 12 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 ด้วยกำลังขยาย 4x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)



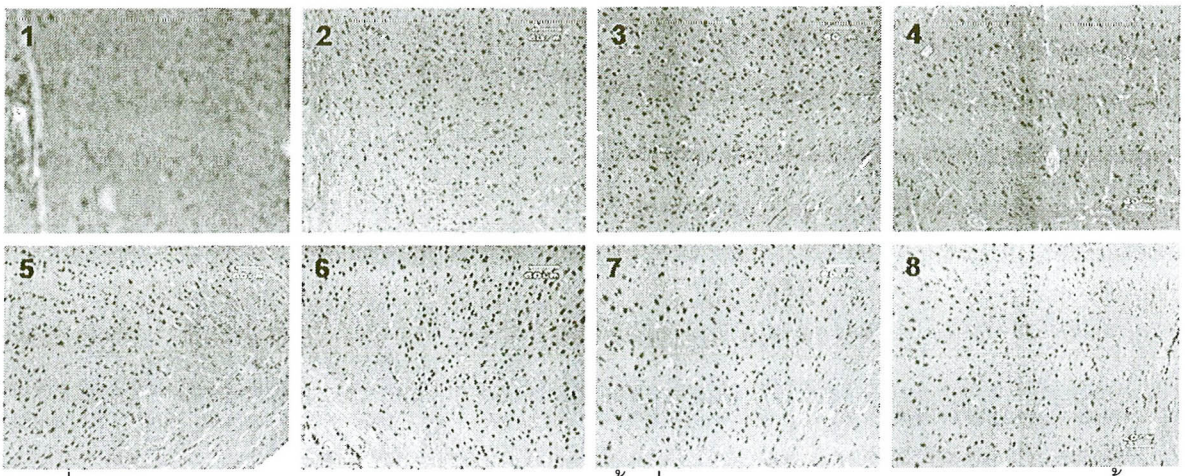
ภาพที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex บริเวณชั้นที่ 4/5 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



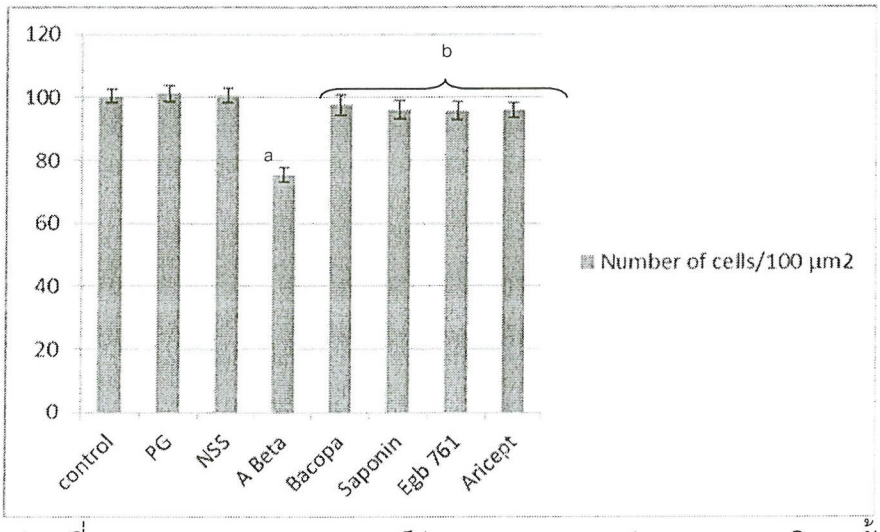
ภาพที่ 14 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 4/5 ด้วยกำลังขยาย 4x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม(1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)



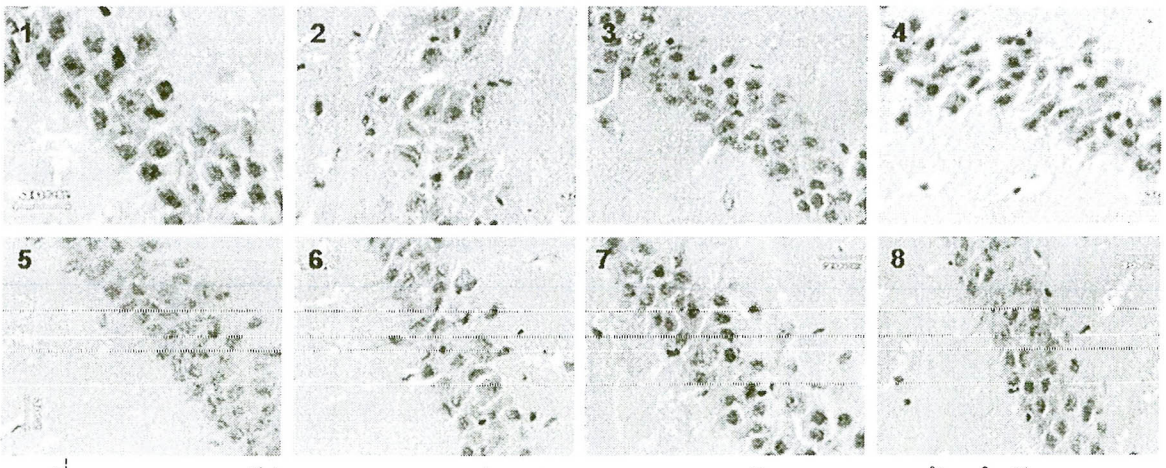
ภาพที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex บริเวณชั้นที่ 4/5 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



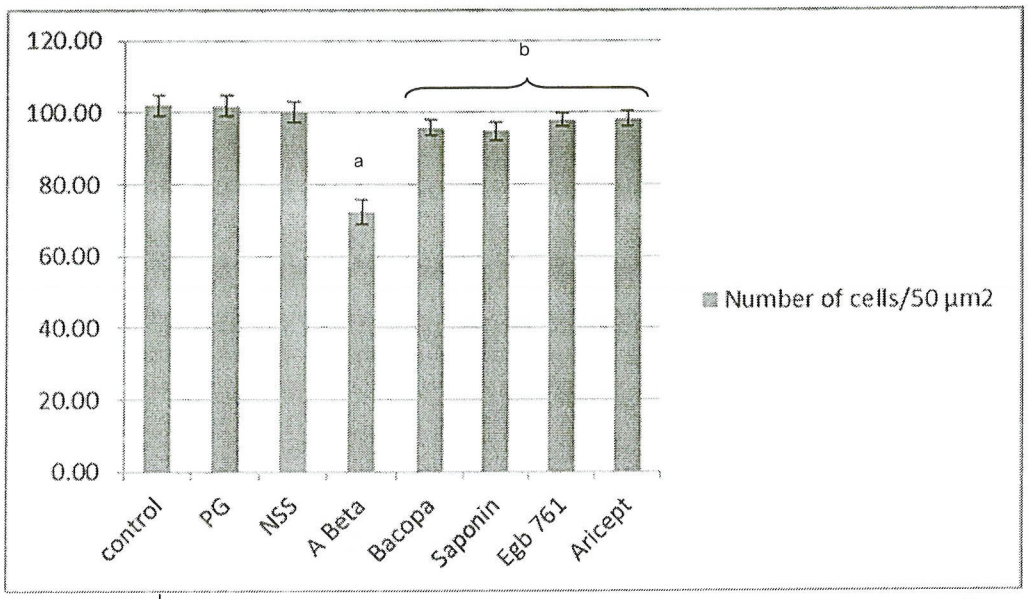
ภาพที่ 16 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 6 ด้วยกำลังขยาย 4x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)



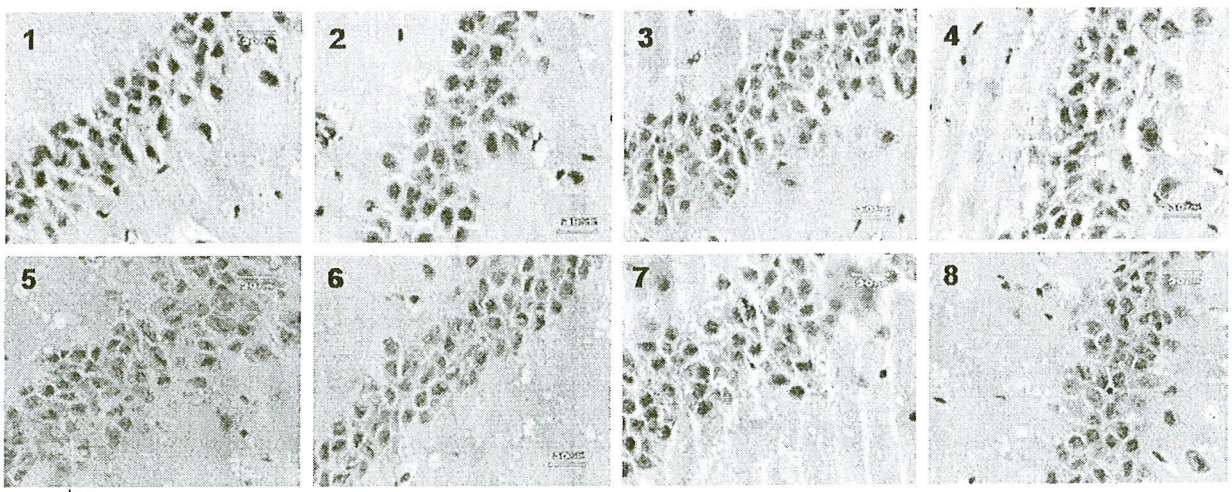
ภาพที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex บริเวณชั้นที่ 6 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



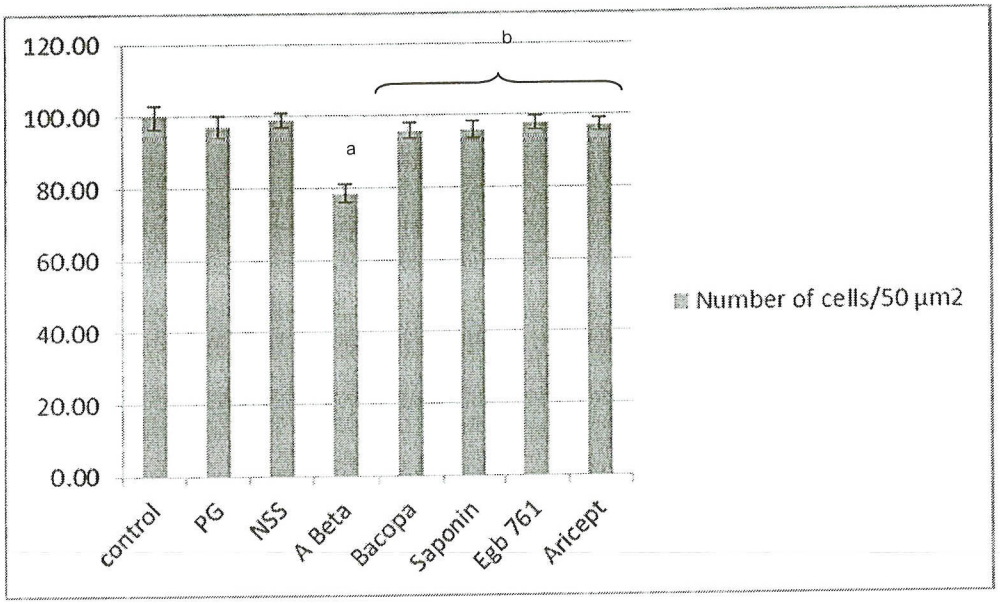
ภาพที่ 18 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 1 ด้วยกำลังขยาย 20x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม(1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)



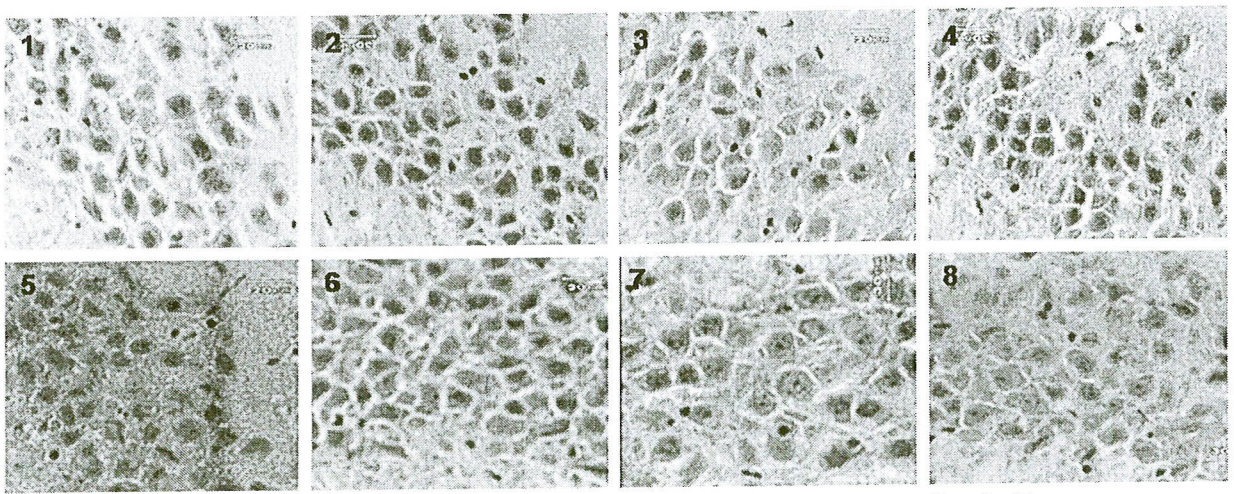
ภาพที่ 19 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



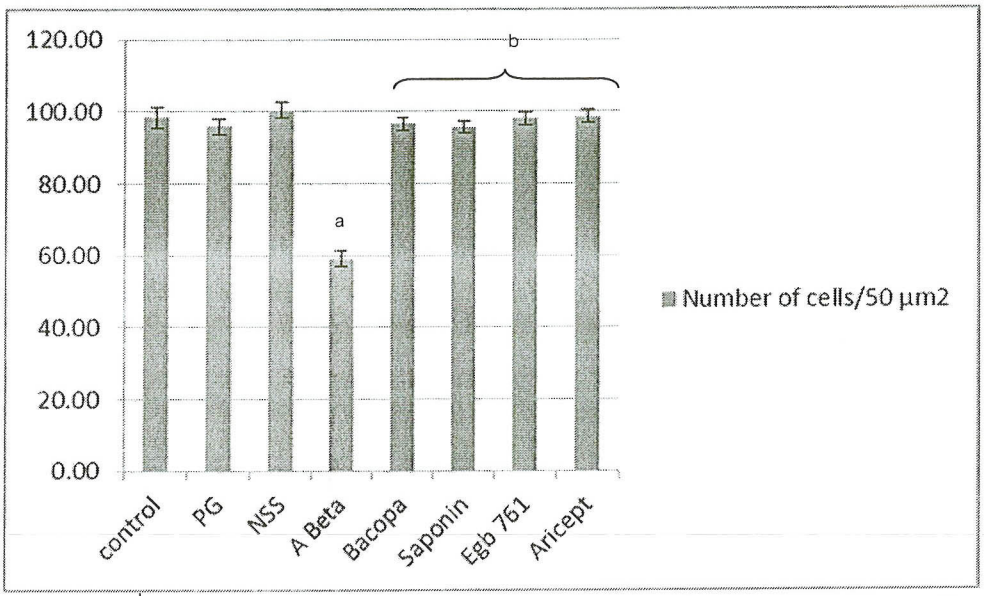
ภาพที่ 20 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 2 ด้วยกำลังขยาย 20x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม(1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)



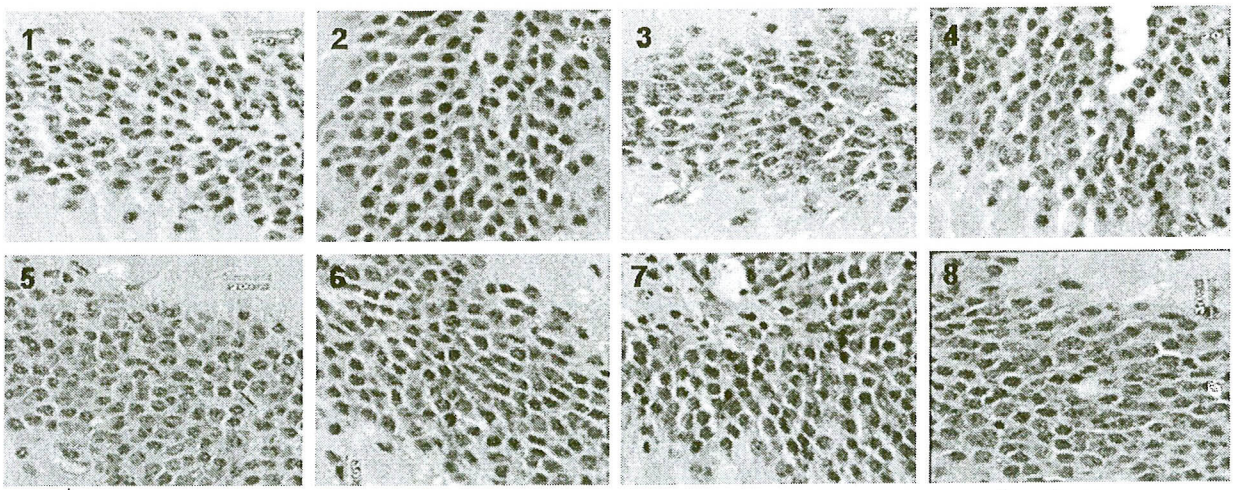
ภาพที่ 21 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA2 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



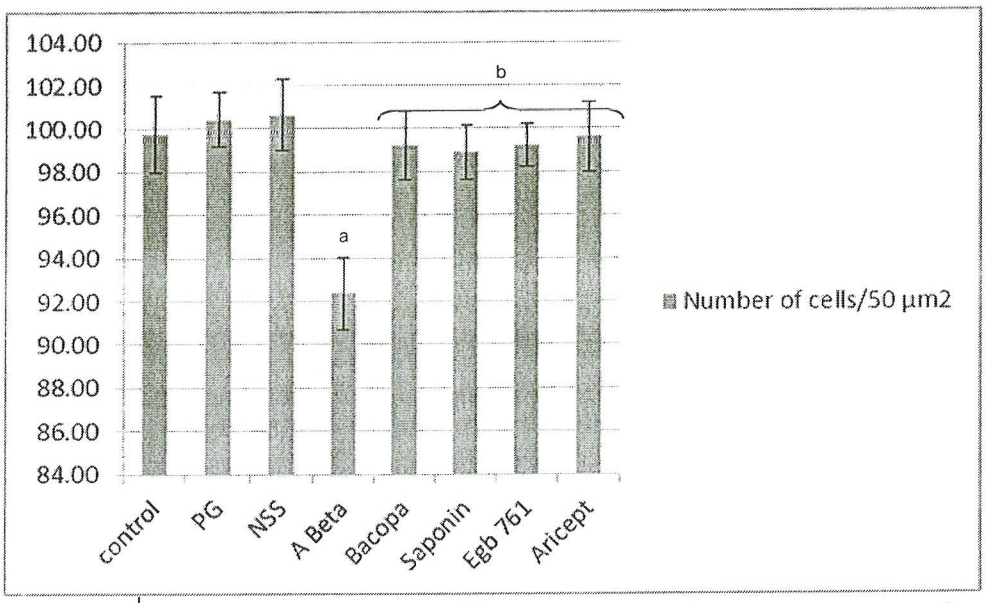
ภาพที่ 22 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 3 ด้วยกำลังขยาย 20x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม(1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)



ภาพที่ 23 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA3 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



ภาพที่ 24 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus ด้วยกำลังขยาย 20x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม(1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

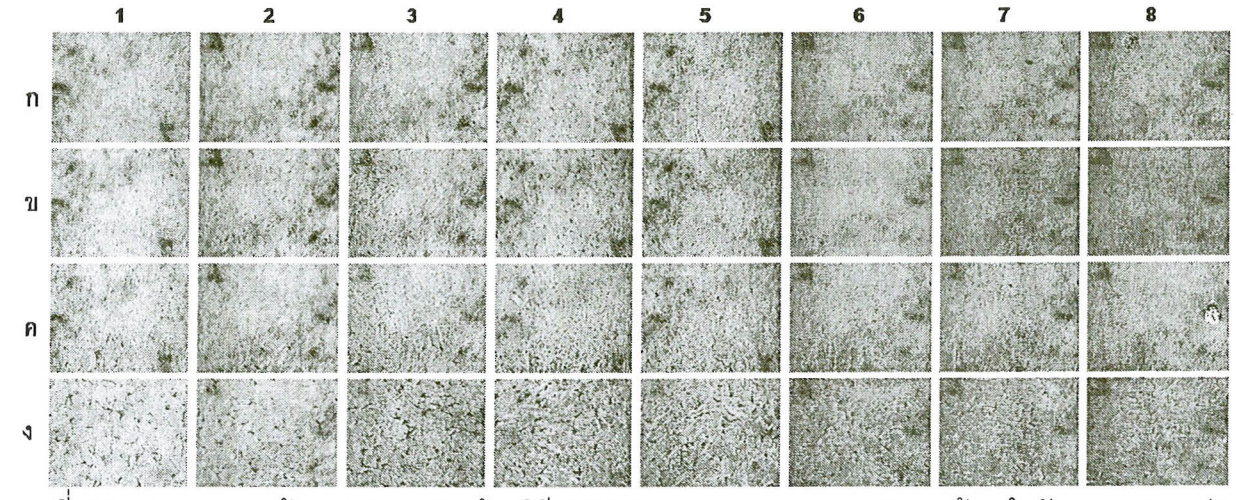


ภาพที่ 25 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณDentate gyrus (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเบต้าอะไมลอยด์)

จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 101.92±2.83 101.82±2.97 และ 100.14±2.74 cells/50µm^2 ตามลำดับ บริเวณ CA2 มีค่า เท่ากับ 99.76±3.32 96.98±3.03 และ 98.86±1.94 cells/50µm^2 ตามลำดับ บริเวณ CA3 มีค่า เท่ากับ 98.38±2.92 95.81±2.23 และ 100.38±2.25 cells/50µm^2 ตามลำดับ และบริเวณ Dentate gyrus มีค่า เท่ากับ 199.77±1.77 100.44±1.28 และ 100.65±1.66cells/50µm^2 ตามลำดับ เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 CA2 CA3 และDentate gyrus ของสัตว์ทดลอง กลุ่มPG+AB นี้มีค่า เท่ากับ 72.35±3.37 cells/50µm^2 78.51±2.54 59.09±2.20 และ 92.36±1.7 cells/50µm^2 ตามลำดับจะเห็นได้ว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ของสัตว์ทดลองที่ได้รับการฉีดด้วย เบต้าอะไมลอยด์ นั้นมีจำนวนที่น้อยกว่า กลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองในกลุ่มNSS นั้นพบว่าจำนวนเซลล์ประสาทของทุกชั้นใน Hippocampus มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาจำนวนของแซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองที่ได้รับยา หรือสมุนไพรที่ควบคู่ไปกับการฉีดด้วย เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle ได้แก่ สัตว์ทดลองในกลุ่ม พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้นพบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณCA1 ของสัตว์ทดลอง นั้นมีค่า เท่ากับ 95.76±2.05 94.74±2.66 97.89±1.76 และ 98.28±2.08 cells/50µm^2 ตามลำดับ บริเวณCA2 มีค่า เท่ากับ 95.77±2.09 95.85±2.30 97.74±2.08 และ 97.17±1.69 cells/50µm^2 ตามลำดับบริเวณCA3 มีค่า เท่ากับ 96.61±1.82 95.63±1.77 98.01±1.78 และ 98.60±1.79

cells/50μm^2 ตามลำดับ และบริเวณ Dentate gyrus มีค่า เท่ากับ 99.21±1.58 98.90±1.25 99.20±0.98 และ 99.61±1.61 cells/50μm^2 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อนำจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่มดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่ม PG+AB แล้วพบว่านั้นมีจำนวนเซลล์ประสาทที่มากกว่าย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทำให้เราทราบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับ พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้นสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเบต้าอะไมลอยด์ได้

นอกจากการวัดจำนวนของเซลล์ประสาทด้วยวิธี H&E แล้วคณะผู้วิจัยยังได้ทำการย้อมเซลล์ประสาท Astrocyte โดยใช้วิธี GFAP Immonohistochemistry เพื่อศึกษาผลกระทบของเบต้าอะไมลอยด์ต่อเซลล์ประสาท Astrocyte และการป้องกันการตายของ Astrocyte ของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดพรมมิและยาต่างๆ ดังแสดงไว้ดังภาพด้านล่าง

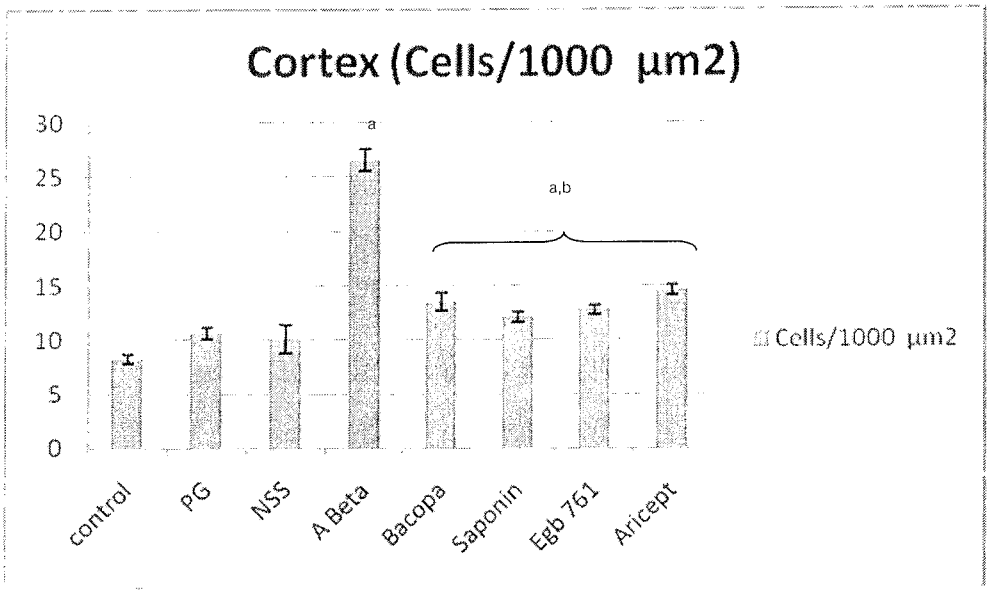


ภาพที่ 26 แสดงผลการย้อม Astrocyte ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า
ภาพ ก-ค แสดง Cortical protoplasmic astrocyte สมองชั้นที่ 2/3 4/5 และ 6 ตามลำดับ
ภาพ ง แสดง Cortical fibrous astrocyte ตรงบริเวณ Cingulum ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม
(1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

หลังจากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการนับประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ในส่วน Cerebral cortex (Cells/1000 μm^2) ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry

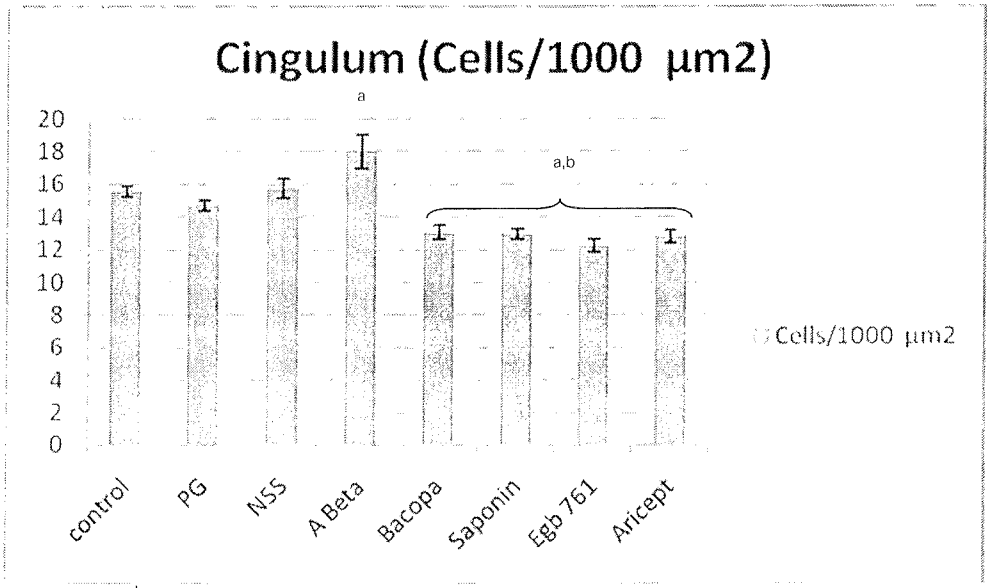
	Cortex	Cingulum
Control	8.22±0.45	15.56±0.33
PG	10.58±0.51	14.67±0.31
PG+NSS	10.08± 1.25	15.75±0.56
PG+ A beta	26.54±1.01	18.00±1.02
Bacopa	13.53±0.83	13.07±0.43
Saponin	12.07±0.51	12.93±0.30
EGb	12.78±0.41	12.22±0.40
Aricept	14.56±0.48	12.82±0.39



ภาพที่ 27 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Cerebral cortex (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

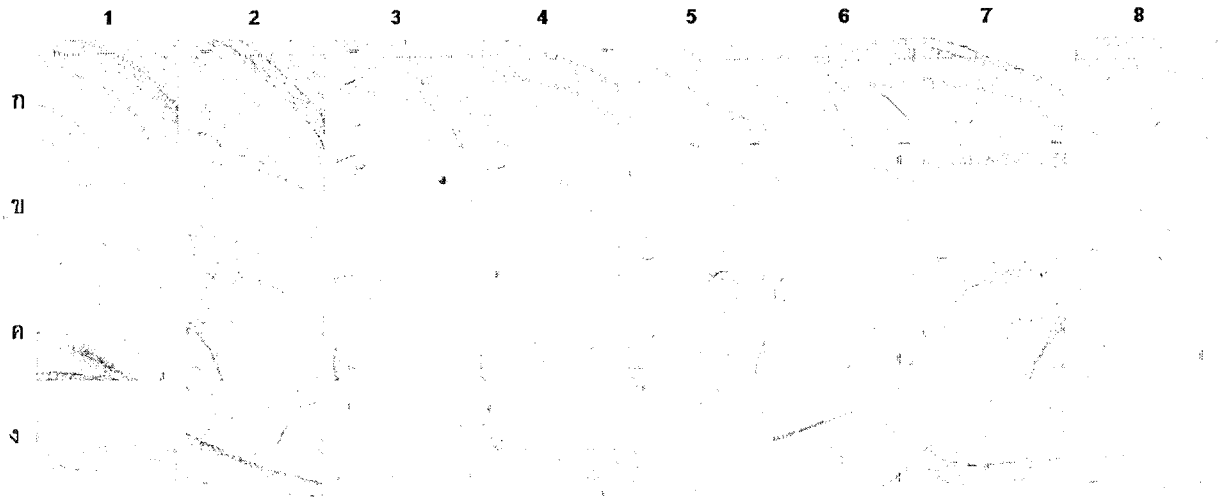
จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Cortex ทั้ง 6 ชั้น ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 8.22±0.45 10.58±0.51 และ 10.08± 1.25 cells/100μm^2 ตามลำดับ ในขณะที่ จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์ มีค่า เท่ากับ 26.54±1.01 cells/100μm^2 ซึ่งมีจำนวน Astrocyte มากกว่าประมาณ 2-3 เท่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p

≤ 0.05) คาดว่าอาจจะเกิดจาก เบต้าอะไมลอยด์ นั้นทำลายเซลล์ประสาท (Neurons)ในสมองส่วน Cortex ทำให้มีการกระตุ้นกลไกให้มีการเพิ่มจำนวนของ Astrocytes มากขึ้น เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดพรมมิ Saponin EGb และ ยา Aricept จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Cortex มีค่าเท่ากับ 13.53±0.83 12.07±0.51 12.78±0.41 และ 14.56±0.48 cells/100μm^2 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ดังกล่าวกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์ รวมถึงกลุ่ม PG+NSS พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลองกลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05)



ภาพที่ 28 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ เซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Cingulum (a = p ≤ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= p ≤ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

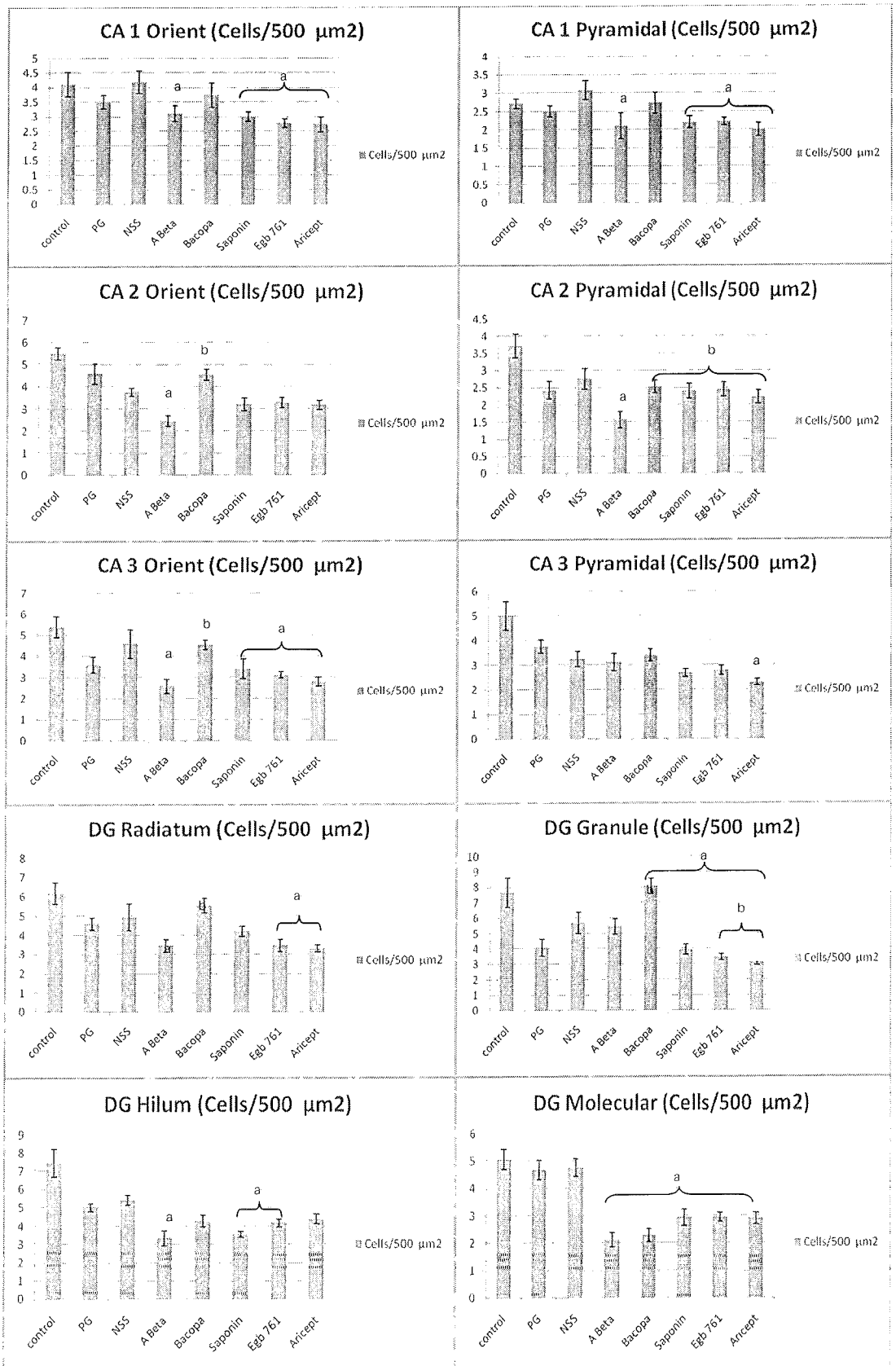
ส่วนจำนวนเซลล์ประสาท Cortical fibrous astrocyte บริเวณ Cingulum ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 15.56±0.33 14.67±0.31และ 15.75±0.56 cells/100μm^2 ตามลำดับ ในขณะที่ จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์ มีค่า เท่ากับ 18.00±1.02cells/100μm^2 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสะกัดพรมมิ Saponin EGb และ ยา Aricept จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte มีค่าเท่ากับ 13.07±0.43 12.93±0.30 12.22±0.40และ 12.82±0.39cells/100μm^2 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์ รวมถึงกลุ่ม PG+NSS พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลองกลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05) เช่นกัน



ภาพที่ 29 แสดงผลการย้อม Astrocyte ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry ด้วยกำลังขยาย 20 เท่า ภาพ ก-ง แสดง Hippocampal protoplasmic astrocyte สมองบริเวณ CA1 CA2 CA3 และ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม ตามลำดับ (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte (Cells/500μm^2) ส่วนของHippocampus บริเวณCA1-3 ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry

	CA1		CA2		CA3	
	Orient	Pyramidal	Orient	Pyramidal	Orient	Pyramidal
Control	4.11±0.41	2.72±0.13	5.50±0.27	3.72±0.34	5.39±0.50	5.00±0.58
PG	3.50±0.23	2.50±0.15	4.58±0.45	2.42±0.26	3.58±0.37	3.75±0.27
PG+NSS	4.17±0.38	3.08±0.26	3.75±0.17	2.75±0.30	4.58±0.67	3.25±0.30
PG+ A beta	3.11±0.26	2.11±0.35	2.44±0.24	1.56±0.24	2.56±0.33	3.11±0.35
Bacopa	3.73±0.41	2.73±0.28	4.53±0.25	2.53±0.19	4.53±0.23	3.40±0.25
Saponin	3.00±0.16	2.20±0.17	3.20±0.29	2.40±0.21	3.40±0.47	2.67±0.15
EGb	2.78±0.15	2.22±0.10	3.28±0.24	2.44±0.20	3.11±0.15	2.78±0.19
Aricept	2.72±0.26	2.00±0.18	3.17±0.20	2.22±0.19	2.78±0.20	2.28±0.13



ภาพที่ 30 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ เซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Orient บริเวณ CA1 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 4.11±0.41 3.50±0.23และ 4.17±0.38 cells/500μm^2 จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Pyramidal บริเวณ CA1 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 2.72±0.13 2.50±0.15 และ 3.08±0.26 cells/500μm^2 เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีด เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle แล้ว จำนวนของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Orient และ Pyramidal บริเวณ CA1 เท่ากับ3.11±0.26และ 2.11±0.35 cells/500μm^{2}ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนที่ลดลงทำให้เราทราบว่าเบต้าอะไมลอยด์นั้นสามารถลดจำนวนของ Astrocyte ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสะกัดสมุนไพรหรือยาต่างๆได้แก่ พรมมิ Saponin EGb และ Aricept พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Orient บริเวณ CA1ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ 3.73±0.41 3.00±0.16 2.78±0.15และ 2.72±0.26cells/500μm^{2}ตามลำดับ ส่วน จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมอง Hippocampus ชั้น Pyramidal บริเวณ CA1ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ 2.73±0.28 2.20±0.17 2.22±0.10และ 2.00±1.18 cells/500μm^{2}ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดพรมมิเท่านั้นที่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาท Astrocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Orient บริเวณ CA2 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 5.50±0.27 4.58±0.45และ 3.75±0.17 cells/500μm^2 จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Pyramidal บริเวณ CA2 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 3.72±0.34 2.42±0.26และ 2.75±0.30cells/500μm^2 เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีด เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle แล้ว จำนวนของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Orient และ Pyramidal บริเวณ CA2 เท่ากับ2.44±0.24และ 1.56±0.24 cells/500μm^{2}ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสะกัดสมุนไพรหรือยาต่างๆได้แก่ พรมมิ Saponin EGb และ Aricept พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Orient บริเวณ CA2 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ 4.53±0.25 3.20±0.29 3.28±0.24และ 3.17±0.20cells/500μm^{2}ตามลำดับ ส่วน จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมอง Hippocampus ชั้น Pyramidal บริเวณ CA2ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ 2.53±0.19 2.40±0.21 2.44±0.20และ 2.22±0.19 cells/500μm^{2}ตามลำดับ ซึ่งจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte บริเวณ CA2ของสัตว์ทดลอง ที่ได้นั้นมีผลเช่นเดียวกันกับจำนวนเซลล์ประสาท

Astrocyte บริเวณ CA1 นั่นคือสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดพรมมิเท่านั้นที่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาท Astrocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Orient บริเวณ CA3 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 5.39±0.50 3.58±0.37และ 4.58±0.67cells/500μm^2 จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Pyramidal บริเวณ CA3 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 5.00±0.58 3.75±0.27และ 3.25±0.30cells/500μm^2 เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีด เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle แล้ว จำนวนของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Orient และ Pyramidal บริเวณ CA3 เท่ากับ 2.56±0.33และ 3.11±0.35 cells/500μm^{2}ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนที่ลดลงโดยเฉพาะจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ชั้น Orient นั้นมีค่าน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสะกัดสมุนไพรหรือยาต่างๆได้แก่ พรมมิ Saponin EGb และ Aricept พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Orient บริเวณ CA3 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ 4.53±0.23 3.40±0.47 3.11±0.15และ 2.78±0.20cells/500μm^{2}ตามลำดับ ส่วน จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมอง Hippocampus ชั้น Pyramidal บริเวณ CA3 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ 3.40±0.25 2.67±0.15 2.78±0.19 และ 2.28±0.13 cells/500μm^{2}ตามลำดับ ทำให้เราทราบว่า จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte บริเวณชั้น Orient เท่านั้นที่สัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดพรมมิเพียงอย่างเดียวที่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาท Astrocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte (Cells/500μm^2) ส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry

	Radiatum	Granule	Hilum	Molecular
Control	6.17±0.56	7.67±0.95	7.44±0.76	5.06±0.36
PG	4.58±0.31	4.07±0.56	5.00±0.21	4.67±0.36
PG+NSS	4.92±0.69	5.67±0.69	5.42±0.26	4.75±0.32
PG+ A beta	3.44±0.33	5.44±0.50	3.33±0.40	2.11±0.26
Bacopa	5.53±0.38	8.07±0.50	4.27±0.33	2.27±0.24
Saponin	4.20±0.27	3.93±0.33	3.53±0.16	2.93±0.30
EGb	3.44±0.31	3.44±0.18	4.17±0.21	2.94±0.17
Aricept	3.28±0.19	3.11±0.19	4.39±0.28	2.89±0.21

จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Radiatum บริเวณ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 6.17±0.56 4.58±0.31และ 4.92±0.69cells/500μm^2 เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีด เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle แล้ว จำนวนของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Radiatum บริเวณ Dentate gyrus มีจำนวน Astrocyte เท่ากับ 3.44±0.33 cells/500μm^{2}ซึ่งมีจำนวนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสะกัดสมุนไพรหรือยาต่างๆได้แก่ พรมมิ Saponin EGb และ Aricept พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Radiatum บริเวณ Dentate ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ 5.53±0.38 4.20±0.27 3.44±0.31และ 3.28±0.19cells/500μm^{2}ตามลำดับ ซึ่งจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดพรมมิเพียงอย่างเดียวที่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาท Astrocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

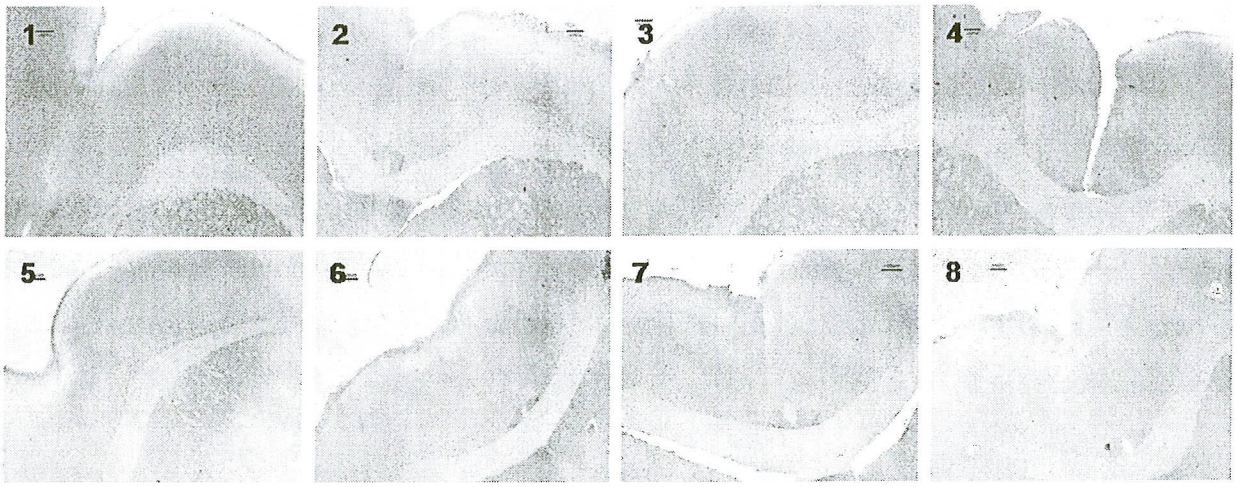
จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Granule บริเวณ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 7.67±0.95 4.07±0.56และ 5.67±0.69cells/500μm^2 เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีด เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle แล้ว จำนวนของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Granule บริเวณ Dentate gyrus มีจำนวน Astrocyte เท่ากับ 5.44±0.50 cells/500μm^{2}นั้นมีค่าน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสะกัดสมุนไพรหรือยาต่างๆได้แก่ พรมมิ Saponin EGb และ Aricept พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Granule บริเวณ Dentate ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ 8.07±0.50 3.93±0.33 3.44±0.18 และ 3.11±0.19cells/500μm^{2}ตามลำดับ ซึ่งจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดพรมมิ แปะก๊วย และ Aricept นั้นที่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาท Astrocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Hilum บริเวณ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 7.44±0.76 5.00±0.21และ 5.42±0.26 cells/500μm^2 เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีด เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle แล้ว จำนวนของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Hilum บริเวณ Dentate gyrus มีจำนวน Astrocyte เท่ากับ 3.33±0.40 cells/500μm^{2}นั้นมีค่าน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสะกัดสมุนไพรหรือยาต่างๆได้แก่ พรมมิ Saponin EGb และ Aricept พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Hilum บริเวณ Dentate ของ

สัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ 4.27±0.33 3.53±0.16 4.17±0.21และ 4.39±0.28 cells/500μm^{2}ตามลำดับซึ่งจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลองที่ได้รับ Saponinและแปะก๊วยนั้นสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาท Astrocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Molecular บริเวณ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 5.06±0.36 4.67±0.36และ 4.75±0.32cells/500μm^2 เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีด เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle แล้ว จำนวนของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Molecular บริเวณ Dentate gyrusมีจำนวน Astrocyte เท่ากับ 2.11±0.26 cells/500μm^2 นั้นมีค่าน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสะกัดสมุนไพรหรือยาต่างๆได้แก่ พรมมิ Saponin EGb และ Aricept พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Molecular บริเวณ Dentate ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ 2.27±0.24 2.93±0.30 2.94±0.17และ 2.89±0.21 cells/500μm^{2}ตามลำดับ

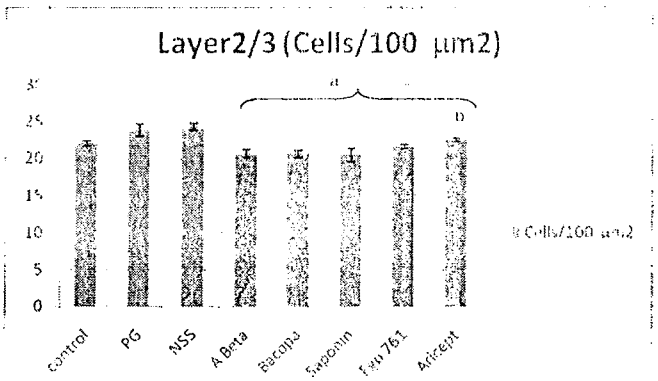
คณะผู้วิจัยยังได้ทำการวัดระดับของจำนวนโปรตีน ชนิด Amyloid precursor protein โดยใช้วิธี Immonohistochemistry ดังแสดงไว้ดังภาพ



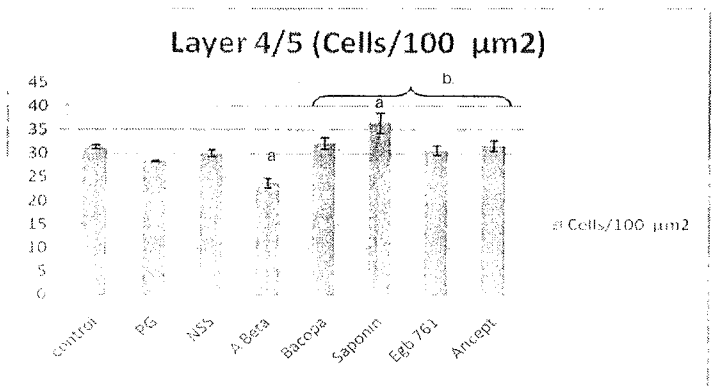
ภาพที่ 31 แสดงผลการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ด้วยกล้องกำลังขยาย 10 เท่าของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท ใน ส่วน Cerebral cortex (Cells/100 μm^2) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Amyloid precursor protein Immonohistochemistry

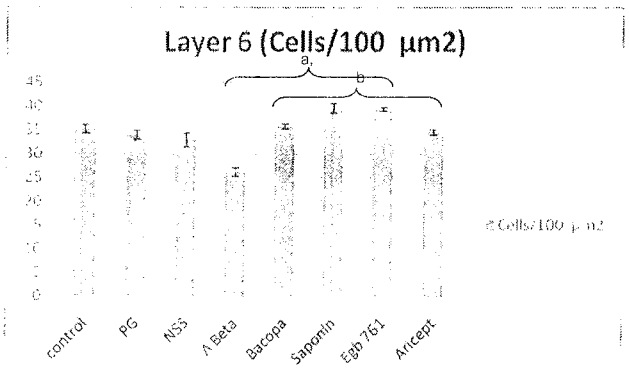
	ชั้นที่ 2/3	ชั้นที่ 4/5	ชั้นที่ 6
Control	22.00±0.37	31.33±0.47	35.17±0.90
PG	23.83±0.82	28.42±0.14	33.92±0.92
PG+NSS	24.25±0.47	30.08±0.73	32.83±1.37
PG+ A beta	20.67±0.52	23.78±0.98	26.11±0.88
Bacopa	20.62±0.43	32.13±1.20	35.67±0.49
Saponin	20.47±0.89	36.40±2.07	39.47±0.96
EGb	21.61±0.32	30.61+1.01	39.28+0.37
Aricept	22.50±0.24	31.61±1.05	34.50±0.50



ภาพที่ 32 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



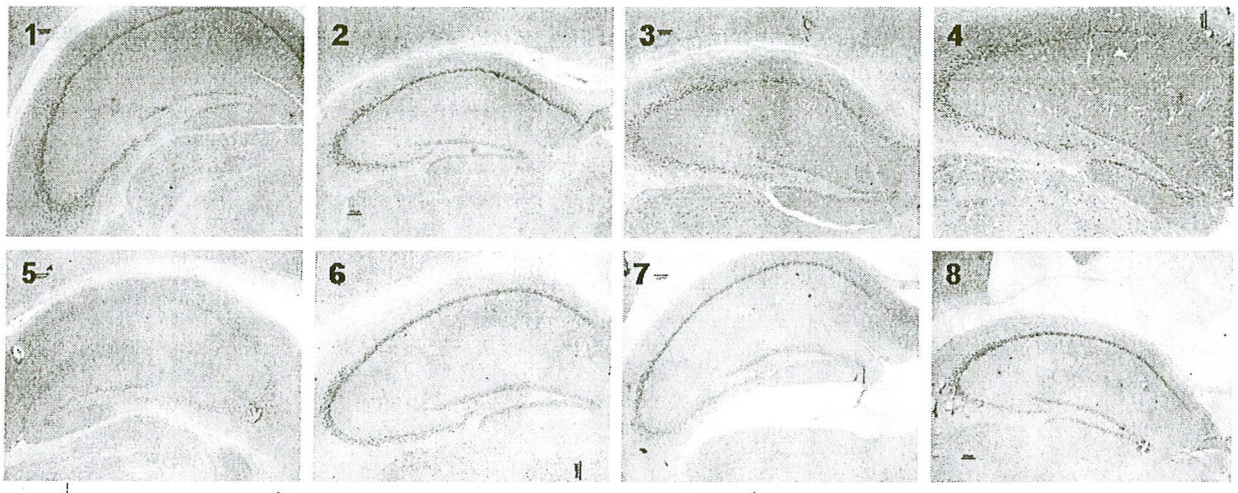
ภาพที่ 33 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 4/5 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



ภาพที่ 34 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 6 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

เซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 ที่ย้อมติดสีจากการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Immonohistochemistry โดยใช้ Amyloid precursor protein antigen ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 22.00±0.37 23.83±0.82และ 24.25±0.47cells/100µm^2 ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5 มีค่า เท่ากับ 31.33±0.47 28.42±0.14และ 30.08±0.73 cells/100µm^2 ตามลำดับ และชั้นที่ 6 มีค่าเท่ากับ 35.17±0.90 33.92±0.92 และ 32.83±1.37 cells/100µm^2 ตามลำดับ เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 4/5 และ ชั้นที่ 6 ของสัตว์ทดลอง กลุ่มPG+AB นี้มีค่า เท่ากับ 20.67±0.52 23.78±0.98และ 26.11±0.88 cells/100µm^2 ตามลำดับ นั้นมีค่าน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อสัตว์ทดลองที่ได้รับยาหรือสมุนไพรที่ควบคู่ไปกับการฉีดด้วย เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle ได้แก่ สัตว์ทดลองในกลุ่ม พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้นพบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่

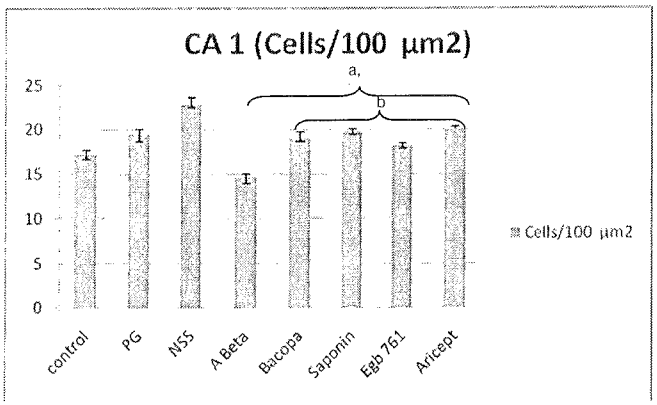
2/3 ของสัตว์ทดลอง นั้นมีค่า เท่ากับ 20.62±0.43 20.47±0.89 21.61±0.32และ22.50±0.24 cells/100μm^2 ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5 มีค่า เท่ากับ 32.13±1.20 36.40±2.07 30.61±1.01และ31.61±1.05 cells/100μm^2 ตามลำดับ และชั้นที่ 6 มีค่า เท่ากับ 35.67±0.49 39.47±0.96 39.28±0.37และ 34.50±0.50 cells/100μm^2 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเซลล์ประสาทบริเวณชั้น 2/3 พรมมิ Saponin แปะก๊วย นั้นไม่การเพิ่มขึ้นของ Amyloid precursor protein ได้ เว้นแต่สัตว์ทดลองในกลุ่ม Aricept เท่านั้นที่มีการเพิ่มขึ้นของ Amyloid precursor protein อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ส่วนเซลล์ประสาทบริเวณชั้น 4/5 พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้นไม่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทได้ เว้นแต่สัตว์ทดลองในกลุ่ม Aricept เท่านั้นที่มีการเพิ่มขึ้นของ Amyloid precursor protein อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สุดท้ายคือเซลล์ประสาทบริเวณชั้น 6 สัตว์ทดลองในกลุ่ม Aricept เท่านั้นที่มีการเพิ่มขึ้นของ Amyloid precursor protein อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



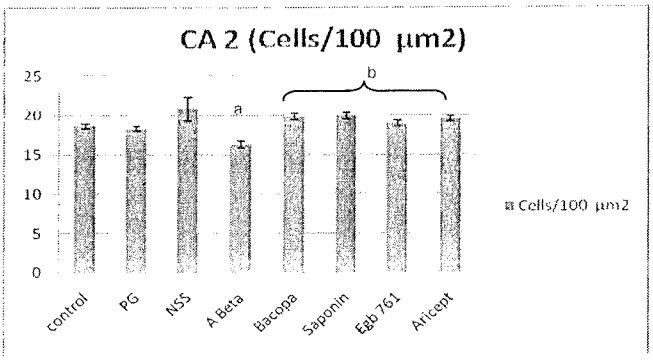
ภาพที่ 35 แสดงผลการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus ด้วยกล้องกำลังขยาย 10 เท่าของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม(1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท ใน ส่วน Hippocampus (Cells/50 μm^2) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Amyloid precursor protein Immonohistochemistry

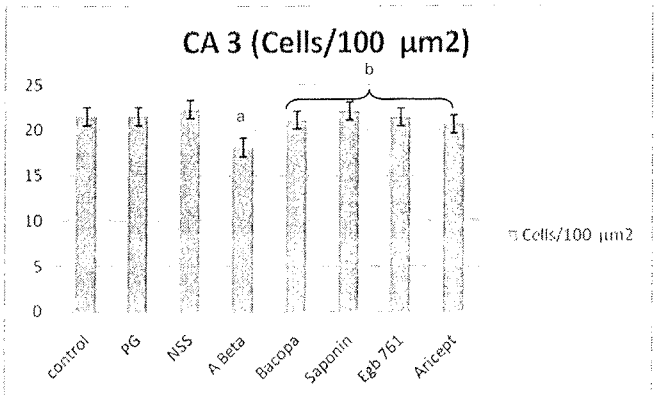
	CA1	CA2	CA3	Dentate gyrus
Control	17.22±0.44	18.67±0.29	21.50±0.30	27.39±0.45
PG	19.42±0.58	18.33±0.31	21.50±0.91	22.42±0.95
PG+NSS	22.83±0.80	20.83±1.44	22.33±1.08	25.58±0.90
PG+ A beta	14.67±0.33	16.33±0.44	18.11±0.51	23.35±0.72
Bacopa	19.00±0.73	19.87±0.41	21.13±0.29	33.13±1.26
Saponin	19.67±0.37	19.93±0.39	22.13±0.56	32.13±1.39
EGb	18.18±0.25	19.00±0.37	21.44±0.46	30.22±0.73
Aricept	20.00±0.30	19.56±0.31	20.63±0.36	30.50±0.73



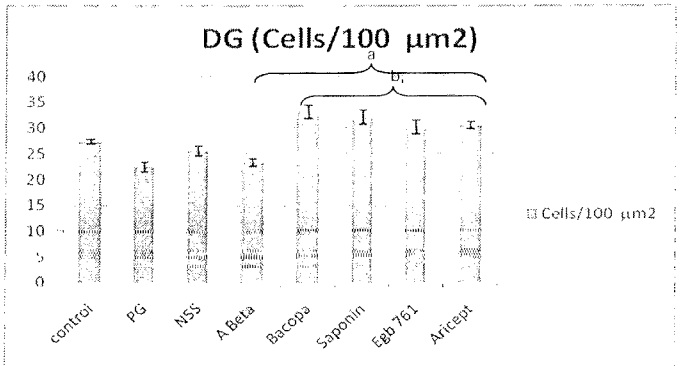
ภาพที่ 36 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 1 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



ภาพที่ 37 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 2 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



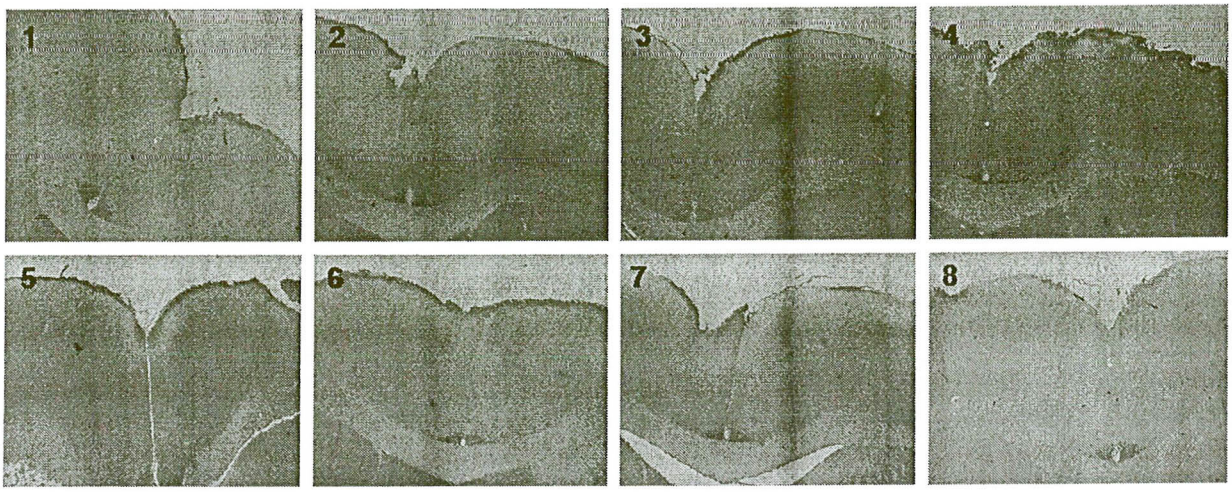
ภาพที่ 38 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 3 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



ภาพที่ 39 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

จำนวนเซลล์ประสาทที่ย้อมติดสีจากการย้อมเซลล์ ด้วยวิธี Amyloid precursor protein Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 17.22±0.44 19.42±0.58และ 22.83±0.80 cells/50μm^2 ตามลำดับ บริเวณ CA2 มีค่า เท่ากับ 18.67±0.29 18.33±0.31 และ 20.83±1.44 cells/50μm^2 ตามลำดับ บริเวณ CA3 มีค่า เท่ากับ 21.50±0.30 21.50±0.91และ 22.33±1.08 cells/50μm^2 ตามลำดับ และบริเวณ Dentate gyrus มีค่า เท่ากับ 27.39±0.45 22.42±0.95และ 25.58±0.90 cells/50μm^2 ตามลำดับ เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 CA2 CA3 และDentate gyrus ของสัตว์ทดลอง กลุ่มPG+AB นี้มีค่าเท่ากับ 14.67±0.33 16.33±0.44 18.11±0.51 และ 23.35±0.72 cells/50μm^2 นั้นมีค่าน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อสัตว์ทดลองที่ได้รับยา หรือสมุนไพรที่ควบคู่ไปกับการฉีดด้วย เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle ได้แก่ สัตว์ทดลองในกลุ่ม พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้นพบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณCA1 ของสัตว์ทดลอง นั้นมีค่าเท่ากับ 19.00±0.73 19.67±0.37 18.18±0.25 และ 20.00±0.30 cells/50μm^2 ตามลำดับ บริเวณCA2 มีค่า เท่ากับ 19.87±0.41 19.93±0.39 19.00±0.37และ 19.56±0.31 cells/50μm^2 ตามลำดับบริเวณCA3 มีค่า เท่ากับ 21.13±0.29 22.13±0.56 21.44±0.46 และ 20.63±0.36 cells/50μm^2 ตามลำดับ และบริเวณ Dentate gyrus มีค่า เท่ากับ 33.13±1.26 32.13±1.39 30.22±0.73และ 30.50±0.73 cells/50μm^2 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อนำจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่มดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่ม PG+AB แล้วพบว่านั้นมีจำนวนเซลล์ประสาทที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทำให้เราทราบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับ พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept สามารถเพิ่มจำนวนของ Amyloid precursor protein อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

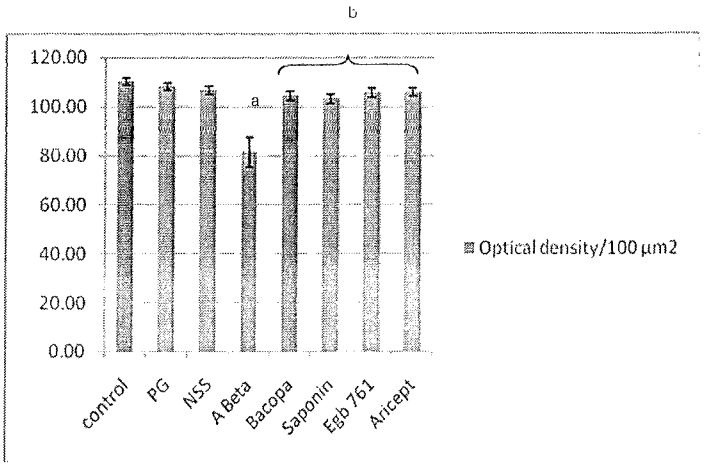
คณะผู้วิจัยยังได้ทำการวัดระดับของจำนวนโปรตีน ชนิด Beta amyloid โดยใช้วิธี Immonohistochemistry ดังแสดงไว้ดังภาพ



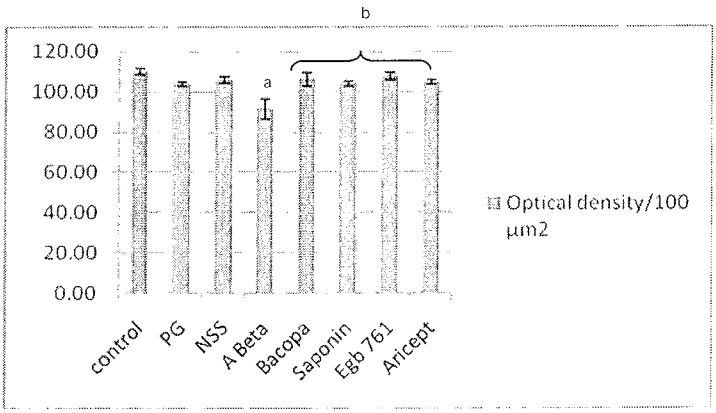
ภาพที่ 40 แสดงผลการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ด้วยกำลังขยาย 10 เท่าของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม(1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

ตารางที่ 6 แสดงผลการวัด Optical density ในพื้นที่ 100 μm^2ใน ส่วน Cerebral cortex ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Beta amyloid Immonohistochemistry

	Layer2/3	Layer4/5	Layer6
Control	110.20±1.51	110.15±1.71	103.98±2.48
PG	108.11±1.47	103.73±1.06	102.22±1.09
PG+NSS	106.78±1.58	105.69±1.64	102.53±0.84
PG+ A beta	81.41±6.18	91.37±5.07	77.81±5.71
Bacopa	104.51±1.87	106.11±3.30	100.80±1.66
Saponin	103.13±1.88	104.07±1.33	101.53±0.80
EGb	105.61±1.75	107.59±1.69	103.46±1.51
Aricept	105.83±1.50	104.61±1.04	106.78±1.74

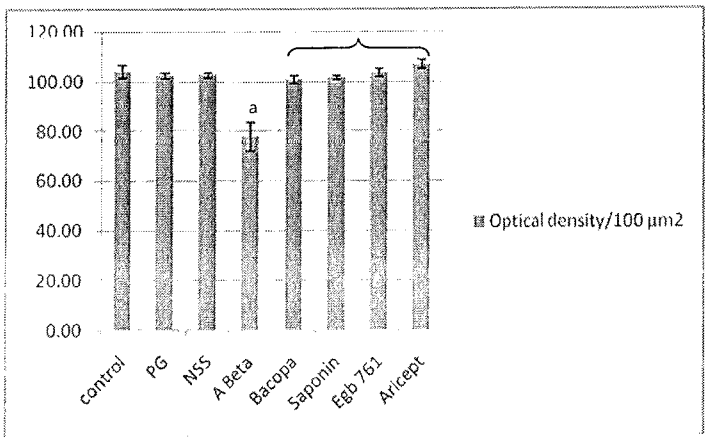


ภาพที่ 41 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



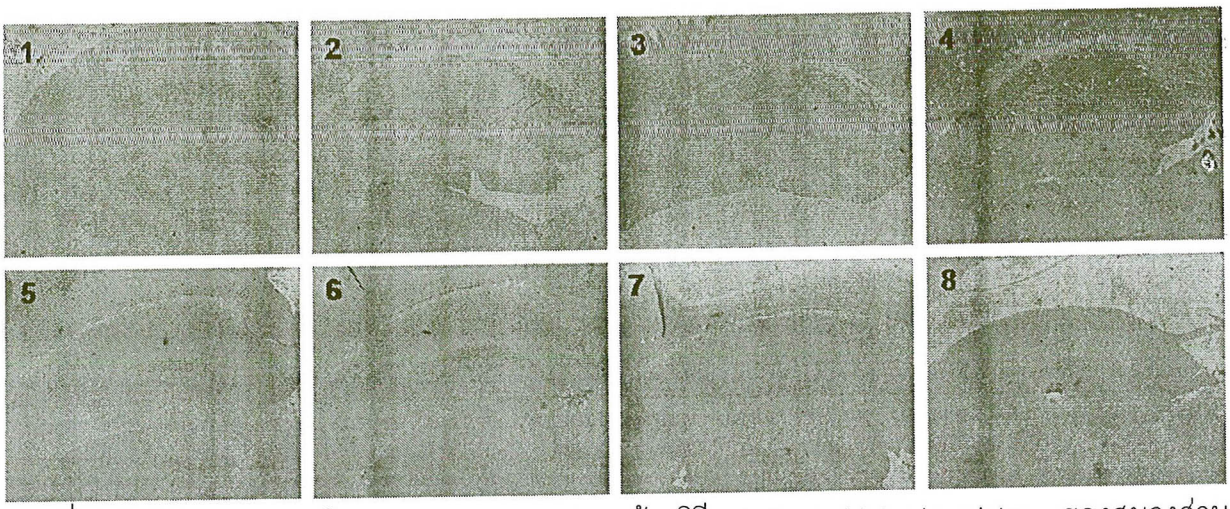
ภาพที่ 42 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 4/5 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

b



ภาพที่ 43 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 6 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

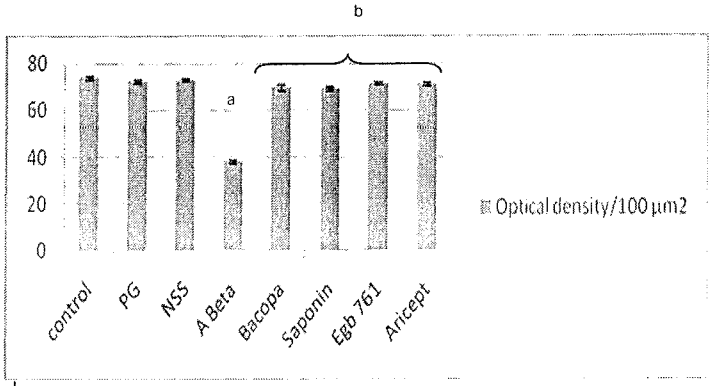
เซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 ที่ย้อมติดสีจากการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Immonohistochemistry โดยใช้ Beta amyloid antigen ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ 110.20±1.51 108.11±1.47และ 106.78±1.58 ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5 มีค่า เท่ากับ 110.15±1.71 103.73±1.06 และ 105.69±1.64 ตามลำดับ และชั้นที่ 6 มีค่า เท่ากับ 103.98±2.48 102.22±1.09 และ 102.53±0.84 ตามลำดับ เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 4/5 และ ชั้นที่ 6 ของสัตว์ทดลอง กลุ่มPG+AB นี้มีค่า เท่ากับ 81.41±6.18 91.37±5.07และ 77.81±5.71 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อสัตว์ทดลองที่ได้รับยา หรือสมุนไพรที่ควบคู่ไปกับการฉีดด้วย เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle ได้แก่ สัตว์ทดลองในกลุ่ม พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้นพบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 ของสัตว์ทดลอง นั้นมีค่า เท่ากับ 104.51±1.87 103.13±1.88 105.61±1.75และ105.83±1.50ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5 มีค่า เท่ากับ 106.11±3.30 104.07±1.33 107.59±1.69 และ104.61±1.04 ตามลำดับ และชั้นที่ 6 มีค่า เท่ากับ 100.80±1.66 103.46±1.51 และ 106.78±1.74 ตามลำดับทำให้เราทราบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับพรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้นสามารถลดความเป็นพิษของเบต้าอะไมลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)



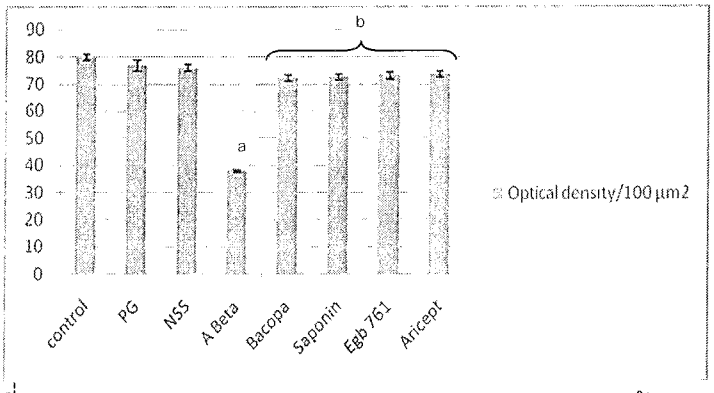
ภาพที่ 44 แสดงผลการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 1 ด้วยกำลังขยาย 1 เท่า ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม(1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

ตารางที่ 7 แสดงผลการวัด Optical density ในพื้นที่ 100 μm^2ใน ส่วน Hippocampus ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Beta amyloid Immonohistochemistry

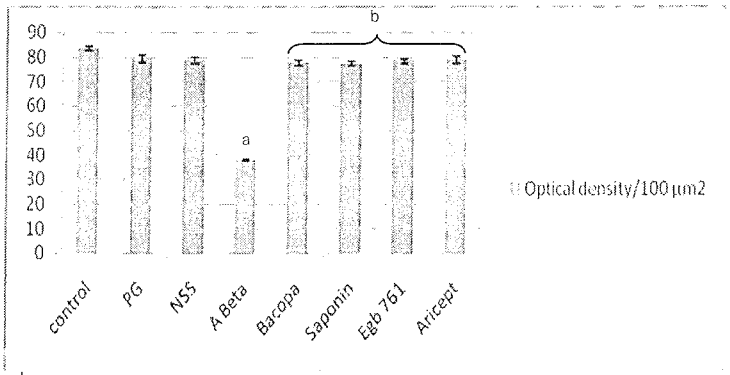
	CA1	CA2	CA3	Dentate gyrus
Control	73.74±0.86	79.74±1.12	83.44±0.95	76.81±1.52
PG	72.11±0.59	76.71±1.87	79.36±1.56	76.16±1.33
PG+NSS	72.81±0.59	75.89±1.30	78.53±1.28	75.19±1.35
PG+ A beta	38.07±0.69	37.93±0.42	37.89±0.32	37.00±0.62
Bacopa	69.69±1.13	72.18±1.22	77.53±1.07	73.82±1.52
Saponin	69.07±0.78	72.49±1.19	77.36±0.77	72.60±1.32
EGb	71.44±0.57	73.19±1.25	78.31±0.91	75.81±0.54
Aricept	71.08±0.60	73.53±1.12	78.81±1.64	75.83±1.97



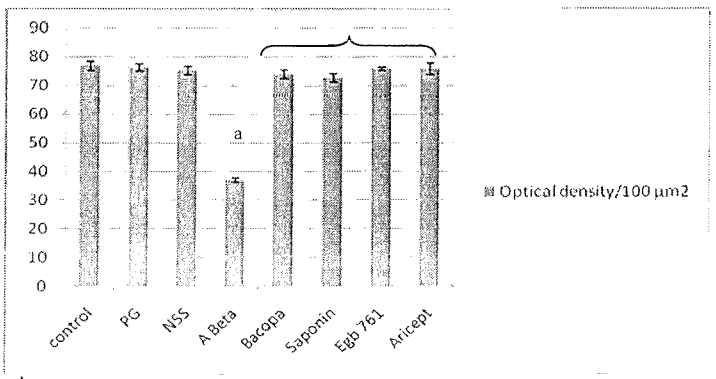
ภาพที่ 45 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 1 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



ภาพที่ 46 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 2 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



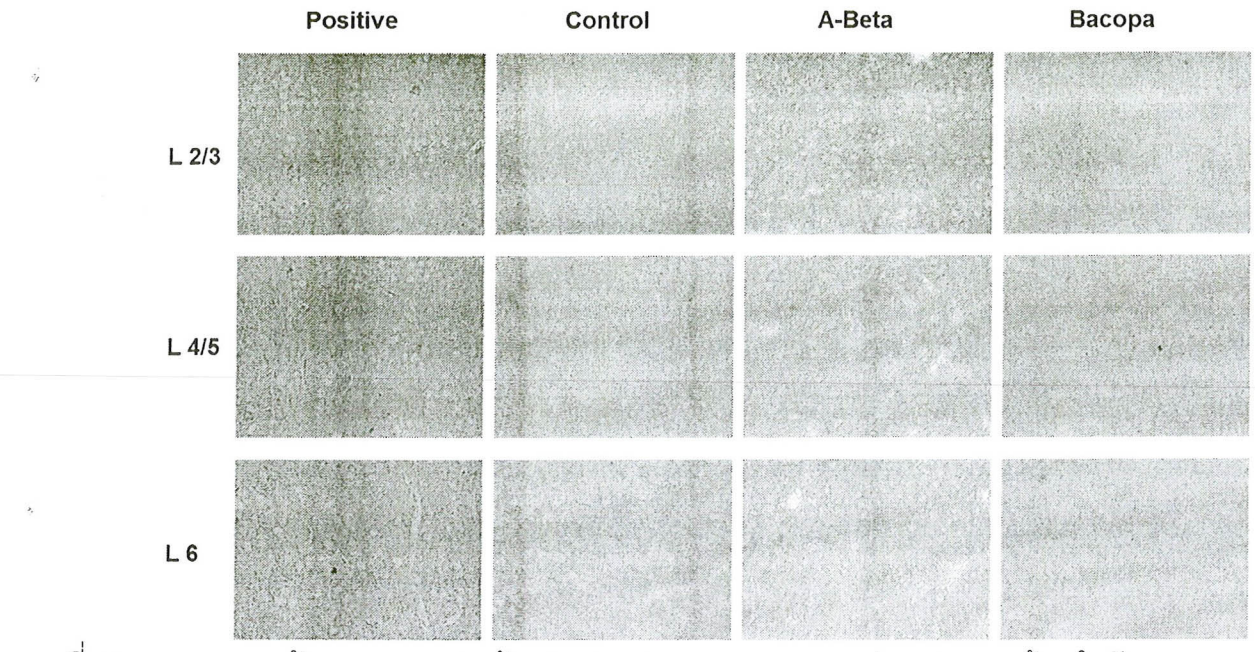
ภาพที่ 47 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 3 (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



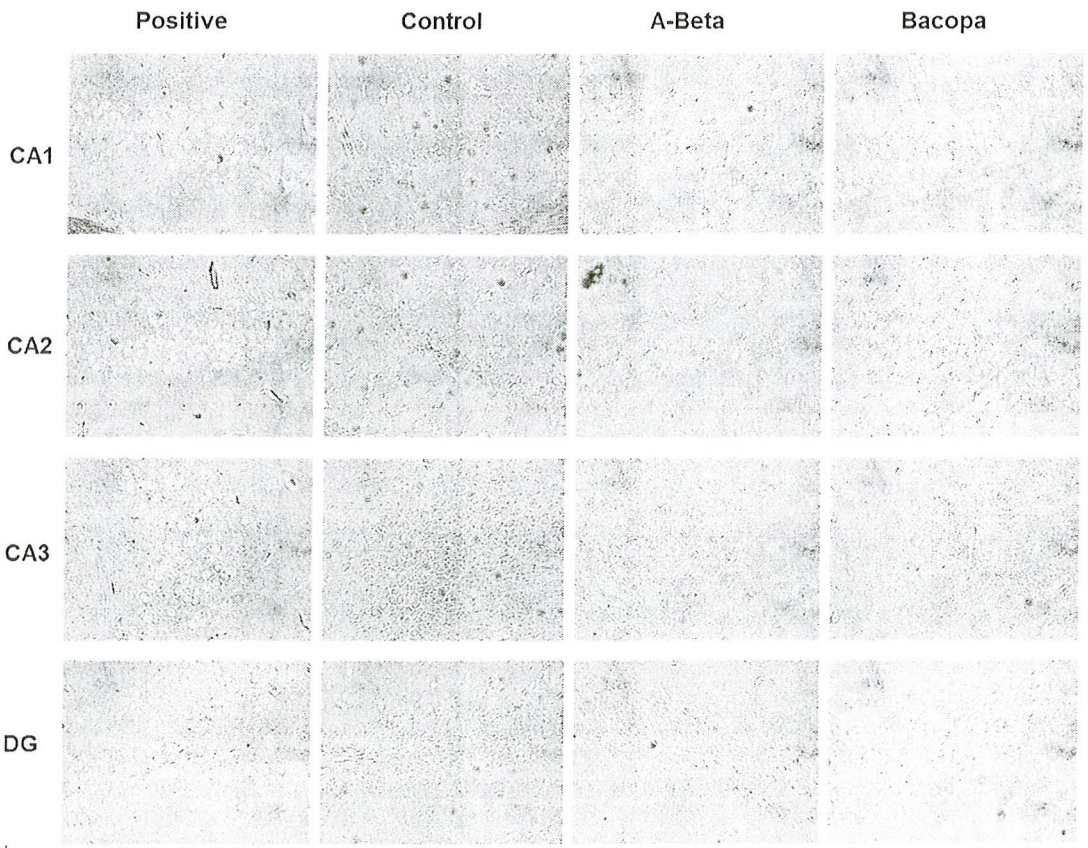
ภาพที่ 48 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus (a = $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b= $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

จำนวนเซลล์ประสาทที่ย้อมติดสีจากการย้อมเซลล์ ด้วยวิธี Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่าเท่ากับ 73.74±0.86 72.11±0.59และ 72.81±0.59 ตามลำดับ บริเวณ CA2 มีค่า เท่ากับ 79.74±1.12 76.71±1.87และ 75.89±1.30 ตามลำดับ บริเวณ CA3 มีค่า เท่ากับ 83.44±0.95 79.36±1.56 และ 78.53±1.28 ตามลำดับ และบริเวณ Dentate gyrus มีค่า เท่ากับ 76.81±1.52 76.16±1.33และ 75.19±1.35 ตามลำดับ เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 CA2 CA3 และDentate gyrus ของสัตว์ทดลอง กลุ่มPG+AB นี้มีค่า เท่ากับ 38.07±0.69 37.93±0.42 37.89±0.32และ 37.00±0.62 ตามลำดับซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาจำนวนของแซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองที่ได้รับยา หรือสมุนไพรที่ควบคู่ไปกับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle ได้แก่ สัตว์ทดลองในกลุ่ม พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้นพบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณCA1 ของสัตว์ทดลอง นั้นมีค่า เท่ากับ 69.69±1.13 69.07±0.78 71.44±0.57และ 71.08±0.60ตามลำดับ บริเวณCA2 มีค่า เท่ากับ 72.18±1.22 72.18±1.22 73.19±1.25 และ 73.53±1.12 ตามลำดับบริเวณCA3 มีค่า เท่ากับ 77.53±1.07 77.36±0.77 78.31±0.91และ 78.81±1.64 ตามลำดับ และบริเวณ Dentate gyrus มีค่า เท่ากับ 73.82±1.52 72.60±1.32 75.81±0.54 และ 75.83±1.97ตามลำดับ ตามลำดับทำให้เราทราบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับพรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้นสามารถลดความเป็นพิษของเบต้าอะไมลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำการวัดระดับของLipofuscin โดยใช้วิธี Sudan Black B ดังแสดงไว้ดังภาพ



ภาพที่ 49 แสดงผลการย้อม Lipofuscin ด้วย Sudan Black B ของสมองส่วน Cortex ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า



ภาพที่ 50 แสดงผลการย้อม Lipofuscin ด้วย Sudan Black B ของสมองส่วน Hippocampus

เมื่อนำสไลด์ที่ผ่านการย้อม Lipofuscin ด้วย Sudan Black B มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายขนาด 40x แล้วพบว่าสัตว์ทดลองทุกกลุ่มที่ได้รับพรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept หรือแม้แต่กระทั่ง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS เองไม่สามารถมองเห็นการสะสมของ Lipofuscin ทำให้คณะผู้วิจัยคาดว่าเบต้าอะไมลอยด์ที่สัตว์ได้รับการฉีดเข้าไปในโพรงสมองนั้นไม่ทำให้เกิดการสะสมของ Lipofuscin

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้นำเอาเบต้าอะไมลอยด์ซึ่งเป็นเปปไตด์ชนิดหนึ่งนำมาเหนี่ยวนำให้มีการเสื่อมของเซลล์ประสาทโดยการฉีดเข้าไปในโพรงสมอง และศึกษาผลของสารสกัดพรมมิ, Enriched saponin, แปะก๊วย และยา Aricept โดยให้สารต่างๆ เหล่านี้ก่อนการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ทางปากในขนาด 40 6.67 100 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมตามลำดับ หลังจากนั้นคณะผู้วิจัย ได้ประเมินพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำด้วยเทคนิค MWMT และ NOR พบว่าสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์นั้นมีความจำที่ลดลง ($p< 0.05$) ขณะที่ในกลุ่มของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาหรือสารสกัดสมุนไพรก่อนการเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์ มีการเพิ่มการเรียนรู้และความจำใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ให้เบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์ ส่วนผลของสารสกัดพรมมิต่อระดับการเกิด Lipid peroxidation พบว่าสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์นั้นมีระดับของ Lipid peroxidation เพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาหรือสารสกัดสมุนไพรก่อนการเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์ นอกจากนี้คณะผู้วิจัย ยังได้ศึกษาผลของยาและสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของสมองโดยดูผลทาง Histology โดยวิธี H&E และ Immonohistochemistry โดยใช้ GFAP, APP, A- beta antibodies ผลการวิจัยพบว่าสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์นั้นเซลล์ประสาทถูกเหนี่ยวนำให้มีการเสียสภาพมากขึ้น ($p< 0.05$) ส่วนกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยาหรือสารสกัดสมุนไพรก่อนได้รับเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์ พบมีจำนวนเซลล์ประสาทที่เสียสภาพลดลงเมื่อเทียบกับกกลุ่มที่ได้รับเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์ ($p< 0.05$) ผลการวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดพรมมิสามารถป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์เปปไตด์และให้ผลใกล้เคียงกันกับยา Aricept และสมุนไพรแปะก๊วย ดังนั้นสารสกัดพรมมิน่าจะถูกนำมาพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจที่นำมาใช้เป็นอาหารเสริมในการป้องกันและรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียความจำได้