

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

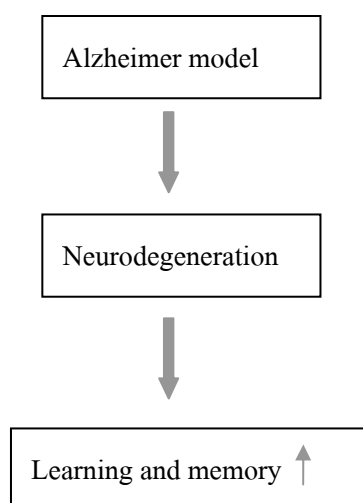
พรมมิ (Brahmi) หรือชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Bacopa monniera* เป็นสมุนไพรที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในหลายประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศอินเดีย ได้มีการรายงานถึงคุณสมบัติหลายด้านของพรมมิ เช่น มีผลในการเพิ่มความจำ มีฤทธิ์ต่อการต้านการซึมเศร้าและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น (Bhattacharya et al., 2000; Calabrese et al., 2008; Das et al., 2002; Holcomb et al., 2006; Hosamani and Muralidhara, 2009; Jyoti, Sethi and Sharma, 2007; Kishore and Singh, 2005; Limpeanchob et al., 2008; Morgan and Stevens, 2010; A. Russo and Borrelli, 2005; Saraf, Prabhakar and Anand, 2010; Sheikh et al., 2007; Singh and Dhawan, 1982; Sivaramakrishna et al., 2005; Stough et al., 2008; Stough et al., 2001; Tripathi et al., 1996; Uabundit et al., 2010; Vohora, Pal and Pillai, 2000; Zhou et al., 2009) อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของพรมมิต่อการเพิ่มความจำนั้นเป็นที่น่าสนใจ นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าพรมมิมิผลในการส่งเสริมพฤติกรรมการเรียนรู้ และความจำในสัตว์ทดลอง (Das, et al., 2002; Jyoti, et al., 2007; Prabhakar et al., 2008; A. Russo and Borrelli, 2005; Alessandra Russo et al., 2003; Saraf, et al., 2010; Sheikh, et al., 2007; Singh and Dhawan, 1982; Zhou, et al., 2009) รวมทั้งยังมีรายงานว่า การให้สารสกัดพรมมิต่ออาสาสมัครนั้นมีสุขภาพดีอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการพัฒนากระบวนการเรียนรู้และความจำเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดพรมมิ (Stough, et al., 2001) จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดพรมมินั้นอาจเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นอาหารเสริม หรือพัฒนาเป็นสูตรตำรับในการนำมาใช้ในการพัฒนาการเรียนรู้ ความจำ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาถึงผลของสารสกัดสมุนไพรพรมมิ สารสกัดพรมมิที่มี Saponin ในปริมาณสูง ว่ามีผลต่อการป้องกันการเสื่อม หรือการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากการสะสมของ Beta-amyloid protein โดยการวัดระดับของ Lipid peroxidation ที่สมองบริเวณ Hippocampus และ Cortex ซึ่งเป็นบริเวณที่สำคัญของสมองในการทำหน้าที่เกี่ยวกับการเรียนรู้และความจำ โดยผลที่ได้ นั้นจะนำมาเปรียบเทียบกับผลของสารสกัดจากสมุนไพรแปะก๊วย EGb 761 และ Aricept ซึ่งมีรายงานว่าทั้ง EGb 761 และ Aricept นั้นสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทได้ และได้นำมาใช้ในการรักษาความจำเสื่อมที่เกิดจากการขาดเลือด (Christen, 2004; deLuna, 2000; Praticò and Delanty, 2000) จากรายงานที่ผ่านมาของการศึกษาเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ นั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมของเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ และทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทขึ้น ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้เกิดความเข้าใจถึงผลของการใช้สมุนไพรพรมมิต่อระบบประสาทส่วนกลาง รวมทั้งการมีศักยภาพของการนำสารสกัดพรมมิไปใช้เป็นอาหารเสริม หรือพัฒนาไปใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ หรือความจำเสื่อมต่อไป โดย

มีงานวิจัยเป็นข้อมูลพื้นฐาน ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดพรมมิต่อการป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์และเปรียบเทียบกับผลของยาอะริเซพและสารสกัดแปะก๊วย

### วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดพรมมิต่อการป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์
2. เพื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากสมุนไพรพรมมิกับสารสกัดแปะก๊วยและ Aricept ต่อการป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์

### ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวคิด (Conceptual Framework) ของโครงการวิจัย



ภาพที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดของการวิจัย

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงผลของสารสกัดพรมมิ สารสกัดพรมมิที่มี Saponin ในปริมาณสูง ในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากการสะสมของเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ ซึ่งการศึกษานี้จะเป็นการศึกษาเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสมุนไพรแปะก๊วย EGb 761 โดยการวัดระดับของ Lipid peroxidation ที่สมองบริเวณ Hippocampus และ Cortex ซึ่งเป็นบริเวณที่สำคัญของสมองในการทำหน้าที่เกี่ยวกับการเรียนรู้ และความจำ

## การทบทวนวรรณกรรมและหรือข้อมูล (Information) ที่เกี่ยวข้อง

พรมมิ (Brahmi) หรือชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Bacopa monniera* เป็นสมุนไพรที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในหลายประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศอินเดีย ได้มีการรายงานถึงคุณสมบัติหลายด้านของพรมมิ เช่น มีผลในการเพิ่มความจำ มีฤทธิ์ต่อการต้านการซึมเศร้าและมีฤทธิ์ด้านการอักเสบเป็นต้น (Dulcy and Rajan, 2009; Hosamani and Muralidhara, 2009; Hota et al., 2009; Prabhakar, et al., 2008; Roodenrys et al., 2002; Russo and Borrelli, 2005; Sairam et al., 2002; Singh and Dhawan, 1982; Stough et al., 2001) อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของพรมมิต่อการเพิ่มความจำนั้นเป็นที่น่าสนใจจากการศึกษาพบว่าพรมมิต่อการแสดงออกทางพฤติกรรมของสัตว์ทดลอง พบว่าพรมมิมีผลในการส่งเสริมกระบวนการเรียนรู้ และความจำนั้น (Prabhakar, et al., 2008; Russo and Borrelli, 2005; Sairam, et al., 2002; Singh and Dhawan, 1982) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการให้สารสกัดพรมมิต่ออาสาสมัครสุขภาพดีอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการพัฒนากระบวนการเรียนรู้และความจำ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดพรมมิ (Stough, et al., 2001) จากการศึกษาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพรมมิในปัจจุบันได้เสนอแนะว่า คุณสมบัติต่อกระบวนการเรียนรู้และความจำของพรมมิอาจจะเกี่ยวข้องกับระบบโคลิเนอร์จิก (Cholinergic system) ในระบบประสาท (Das, et al., 2002; Dhawan and Singh, 1996; Limpeanchob, et al., 2008; Prabhakar, et al., 2008; Russo and Borrelli, 2005) ความบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำนั้นเป็นปัญหาที่สำคัญของโรคทางระบบประสาทหลายชนิด เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายและพบว่าการเสื่อม หรือการตายของเซลล์ประสาทในบริเวณของสมองที่เกี่ยวข้องกับความจำ ได้แก่สมองส่วน Hippocampus และ Frontal cortex นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า กลูตาเมต (Glutamate) และ เบตาอะไมลอยด์ เปปไทด์ (Beta-amyloid peptide) ยังแสดงบทบาทสำคัญต่อการเกิดของโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โดยทำให้เกิดการเสื่อม หรือการถูกทำลายของเซลล์ประสาท (Dhawan and Singh, 1996; Khan, Krishnakumar and Paulose, 2008; Singh and Dhawan, 1997) กลไกอย่างหนึ่งต่อการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก Beta-amyloid peptide นั้นสัมพันธ์กับ Oxidative stress (Anbarasi et al., 2006; Aucoin et al., 2005; A. D. Butterfield et al., 2002; D. A. Butterfield and Bush, 2004; D. A. Butterfield et al., 2001; D. A. Butterfield et al., 2007; Café et al., 1996; Cardoso, Pereira and Oliveira, 1999; Gibson and Huang, 2005; Jellinger, 2007) ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทตามมา (D. A. Butterfield, et al., 2001; D. A. Butterfield et al., 1999; Chauhan and Chauhan, 2006; Markesbery, 1997; Moreira et al., 2007) นอกจากนี้การกระตุ้น NMDA receptors จากยังเกิดขึ้นจากภาวะการขาดอากาศ (Hypoxia) ขาดเลือด (Ischaemia) หรือ ขาดน้ำตาล (Hypoglycaemia) ในระบบประสาท

ส่วนกลาง และทำให้เซลล์ประสาทถูกทำลาย (Neuronal damage and degeneration) (Choi 1988) จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดพรมมินั้นอาจเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นอาหารเสริม หรือพัฒนาเป็นสูตรตำรับในการนำมาใช้ในการพัฒนาการเรียนรู้ ความจำ โดยผ่านกลไกการทำงานที่อาจจะไปลดการเสื่อมของเซลล์ประสาท ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรพรมมินิ สารสกัดพรมมินิที่มี Saponin ในปริมาณสูง ว่ามีผลต่อการป้องกันการเสื่อมหรือการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากการสะสมของ Beta-amyloid protein โดยวัดระดับของ Lipid peroxidation ที่สมองบริเวณ Hippocampus และ Cortex ซึ่งเป็นบริเวณที่สำคัญของสมองในการทำหน้าที่เกี่ยวกับการเรียนรู้และความจำ นอกจากนี้การศึกษานี้จะเป็นการศึกษาเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสมุนไพรแปะก๊วย EGb 761 และ Aricept ซึ่งมีรายงานว่าทั้ง EGb 761 และ Aricept นั้นสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทได้ และได้นำมาใช้ในการรักษาความจำเสื่อมที่เกิดจากการขาดเลือด (Christen, 2004; deLuna, 2000; Francis, Ramirez and Lai, 2010; Harper et al., 2004; Praticò and Delanty, 2000) จากรายงานที่ผ่านมาของการศึกษาเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ นั้นเกี่ยวข้องกับการสะสมของเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ และทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทขึ้น ผลที่ได้จากการศึกษารั้งนี้จะทำให้เกิดความเข้าใจถึงผลของการใช้สมุนไพรพรมมินิต่อระบบประสาทส่วนกลาง รวมทั้งการมีศักยภาพของการนำสารสกัดพรมมินิไปใช้เป็นอาหารเสริม หรือพัฒนาไปใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ หรือความจำเสื่อมต่อไป โดยมีงานวิจัยเป็นข้อมูลพื้นฐาน



## เนื้อเรื่อง

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรเพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ น้ำหนัก 25–35 กรัม ถูกเลี้ยงในกรงสเตนเลส กรงละ 5 ตัว ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  °C ซึ่งได้รับน้ำและอาหารอย่างเพียงพอ เพื่อลดภาวะเครียดของสัตว์ทดลอง ก่อนทำการทดลองสัตว์ได้พักฟื้นเป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นได้ถูกแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

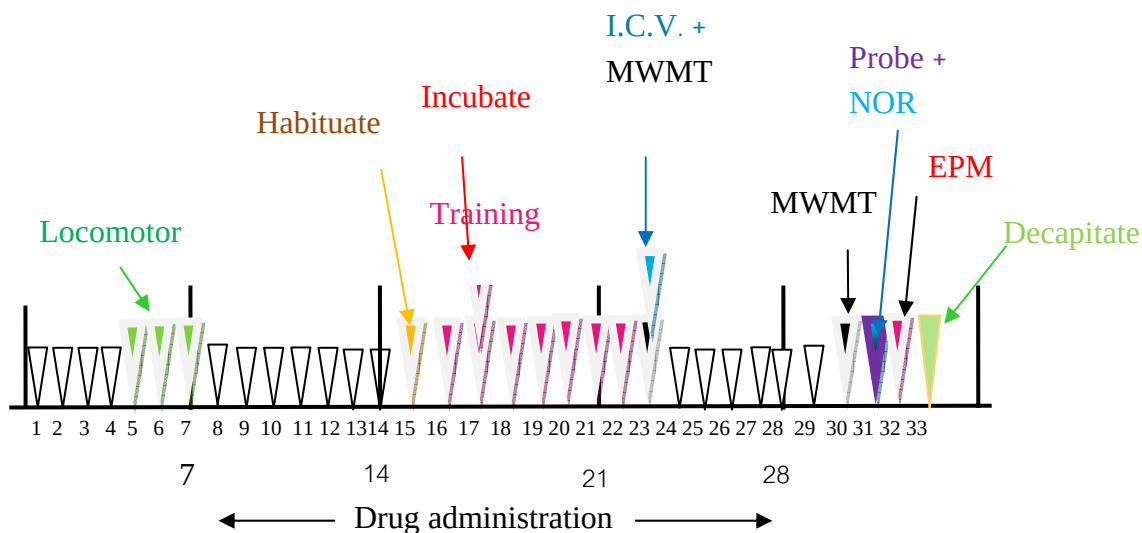
1. กลุ่ม Control จำนวน 10 ตัว
2. กลุ่ม PG จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อน Propylene glycol (PG) ทางปาก ซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารสกัดพรมมิ
3. กลุ่ม PG-NSS จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อน PG ทางปาก และถูกฉีดด้วย 0.9% Normal saline solution เข้าไปที่ Lateral ventricle
4. กลุ่ม PG- $\text{A}\beta$  จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อน PG ทางปาก และถูกฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปที่ Lateral ventricle
5. กลุ่ม BA-  $\text{A}\beta$  จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อนสารสกัดพรมมิ ขนาด 40 mg/kg ทางปากและถูกฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปที่ Lateral ventricle
6. กลุ่ม Saponin-  $\text{A}\beta$  จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อน Saponin enriched ความเข้มข้น 30% ด้วยขนาด 6.67 mg/kg ทางปาก และถูกฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ เข้าไปที่ Lateral ventricle
7. กลุ่ม EGb -  $\text{A}\beta$  จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อนด้วยสารสกัดแปะก๊วยขนาด 100 mg/kg ทางปาก และถูกฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปที่ Lateral ventricle
8. กลุ่ม Aricept-  $\text{A}\beta$  จำนวน 7 ตัว สัตว์ทดลองได้รับการป้อนทางปากด้วย Aricept ขนาด 0.2 mg/kg และถูกฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ เข้าไปที่ Lateral ventricle

ก่อนการให้ยา สัตว์ทดลองจะทำการจัดกลุ่มโดยอาศัยการตรวจความสามารถในการเคลื่อนไหว (locomotor activity test)

รายละเอียดการให้ยาแก่สัตว์ทดลองมีดังนี้คือ

1. สัตว์ทดลองได้รับยา 2 สัปดาห์ก่อน และ 1 สัปดาห์หลังการฉีดเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปที่ Lateral ventricle

2. การให้ยาสัตว์ทดลองได้รับยาโดยวิธีใส่ท่อเข้าไปในหลอดอาหาร (Feeding needle) วันละ 1 ครั้งตอนเช้าด้วยปริมาตร 200  $\mu\text{l}$



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 แล้วนั้นสัตว์ทดลองจะถูกฆ่าโดยการดิงกระดูกคอ สมองของสัตว์ถูกผ่าแล้วนำมาวัดระดับของ lipid peroxidation และย้อมสีของเซลล์ประสาทต่อไป

### การเตรียมสารสกัดพรมิ

ลำต้นของพรมิถูกตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆแล้วนำไปอบให้แห้ง จากนั้นนำไปแช่ใน ethanol ความเข้มข้น 95% นาน 8 ชั่วโมง แล้วนำไปอบแห้งอีกครั้ง หลังจากนั้นทำการระเหย ethanol ออกโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ทำให้ได้สารสกัดพรมิที่มีความเข้มข้น 5% และ 30 % ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดพรมิที่ได้นั้นมีส่วนผสมของ Saponin เป็นหลักประกอบด้วย bacoside A3, bacoside II, bacopa saponin X, bacosaponin C and bacoside 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  $-20^{\circ}\text{C}$  ก่อนการนำมาฉีดเข้า Lateral ventricle เบต้าอะไมลอยด์ถูกบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลาติดต่อกัน 4 วัน และถูกส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อให้แน่ใจว่า 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  $\mu\text{l}$  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  $A\beta$  ยา และสารสกัดสมุนไพร โดยจัดทำอ่างที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 110 เซนติเมตร ที่แบ่งออกเป็น 4 ส่วน และมีแท่น (Hidden platform) เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ฝังอยู่ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ 1 เซนติเมตร และให้สัตว์ทดลองว่ายน้ำในน้ำแบ่งขุ่นที่มีความลึก 13 เซนติเมตร สัตว์ทดลองจะถูกปล่อยลงที่จุดกึ่งกลางของขอบอ่าง เป็นเวลา 60 วินาทีและจับเวลาในการว่ายน้ำของสัตว์ทดลองที่ไปยืนค้ำบน Hidden platform เป็นเวลา 10 วินาที แล้วจึงนำมาพัก 5 นาทีและทำการทดลองอีกโดยการปล่อยสัตว์ทดลองลงในตำแหน่งจุดกึ่งกลางของขอบอ่างอีก 2 ส่วน ปฏิบัติเช่นนี้เป็นเวลา 7 วันติดต่อกันเพื่อให้สัตว์จดจำแท่น Platform หลังจากสัตว์ทดลองได้รับ  $A\beta$  แล้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและ 7 วัน สัตว์ทดลองจะถูกนำมา

ทดสอบการวัดความจำเกี่ยวกับสถานที่อีกครั้งโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้างต้น และบันทึกระยะเวลาที่สัตว์ทดลองใช้ในการว่ายน้ำหาแท่น (Escape latency) สัตว์ทดลองที่ใช้เวลาในการว่ายน้ำหาแท่นได้น้ำได้สั้นถือว่ามีสามารถในการจำสถานที่ได้มากกว่าตัวที่ใช้เวลานานกว่า และนำผลที่ได้ก็นำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

#### The Novel Object Recognition (NOR) test

เป็นการทดสอบความจำที่ไม่ใช่ความจำเกี่ยวกับสถานที่ของสัตว์ทดลอง อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองนั้นประกอบด้วยกล่องพลาสติกขนาด  $37 \times 51 \times 20 \text{ cm}^3$  และวัตถุจำนวน 3 ชิ้นที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้แก่ รถเขรามิคกี้แดง แก้วทรงสี่เหลี่ยมสีฟ้าและขวดสีชา ก่อนทำการทดสอบปล่อยให้สัตว์ทดลองอยู่ในกล่องทดสอบเพื่อปรับสภาพความเคยชินเป็นเวลา 10 นาที การทดสอบเริ่มขึ้นโดยวางวัตถุ 2 ชิ้นคือ รถเขรามิคกี้แดงและแก้วทรงสี่เหลี่ยมสีฟ้าที่กลางกล่องและให้วัตถุทั้งสองห่างกัน 15 cm หลังจากนั้นทำการปล่อยสัตว์ทดลองลงตรงกลางของวัตถุทั้งสอง ทำการจับเวลาที่สัตว์ทดลองเอาจมูกแตะ มาสัมผัสกับวัตถุทั้งสองชนิดที่ระยะน้อยกว่า 1 cm เป็นเวลา 5 นาที แล้วบันทึกเวลาเป็น  $T_a$  และ  $T_b$  เพื่อนำมาคำนวณเป็นค่าร้อยละความชอบของวัตถุ (% Preference index) =  $[(T_a \times 1000) / (T_a + T_b)]$  เสร็จแล้วนำเอาแก้วทรงสี่เหลี่ยมสีฟ้าออกแล้วนำเอาขวดสีชาเข้าไปแทนที่ หลังจากนั้นนำสัตว์ปล่อยลงตรงกลางของวัตถุทั้งสองแล้วทำการจับเวลาเช่นเดียวกันเป็น  $T_a$  และ  $T_c$  แล้วคำนวณหาค่าร้อยละการจำวัตถุสิ่งใหม่ (% Recognition index) =  $[(T_c \times 1000) / (T_a + T_c)]$  และนำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

#### Elevated plus-maze (EPM) test

เป็นการทดสอบภาวะการวิตกกังวลของสัตว์ทดลอง ซึ่งอาศัยพฤติกรรมธรรมชาติของสัตว์ทดลอง โดยสัตว์ทดลองปกติจะมีนิสัยอยากรู้อยากเห็น ส่วนสัตว์ทดลองที่มีอาการวิตกกังวลมักจะชอบที่จะอยู่ในที่มีมืดและกลัวความสูง อุปกรณ์ที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย Open arms ขนาด  $25 \times 5 \text{ cm}$  และมีผนังสูง 0.5 cm จำนวน 2 ชิ้นวางตั้งฉากกัน และ closed arms ขนาด  $25 \times 5 \text{ cm}$  และมีผนังสูง 16 cm จำนวน 2 ชิ้นวางตั้งฉากเช่นกันตรงกลางของ Arm ทั้งสองนั้นเป็น Center area ที่มีขนาด  $5 \times 5 \text{ cm}$  อุปกรณ์นี้วางอยู่บนขาตั้งที่มีความสูง 50 cm และวางไว้ในอ่าง Morris water maze เพื่อป้องกันไม่ให้สัตว์ทดลองหนีจากการทดสอบ วิธีการทดสอบทำได้โดยการปล่อยสัตว์ทดลองวางไว้ตรง Center area ของอุปกรณ์และให้สัตว์ทดลองเคลื่อนไหวโดยอิสระ หลังจากนั้นทำการบันทึกภาพวิดีโอและจับเวลาที่สัตว์ทดลองเข้าไปใน 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 peroxidation 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 ก่อนถูกก่อาบในพาราฟิน จากนั้นเนื้อเยื่อถูกนำไปฝังในพาราฟิน และถูกตัดที่ความหนาประมาณ 5 ไมโครเมตร เพื่อทำการย้อมเซลล์ประสาทด้วยวิธี H&E เพื่อดูการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์

##### วิธีการย้อมเซลล์ประสาทด้วยวิธี H&E

นำเนื้อเยื่อของสมองที่ถูกฝังในพาราฟินและถูกตัดที่ความหนา 5 ไมโครเมตร มาทำการจุ่มในโกที่มีสารเคมีต่างๆตามเวลาดังนี้

| โกที่ | 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     | Haematoxyline     | 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 | Permunt      |         |

#### สถิติที่ใช้ในการวิจัย

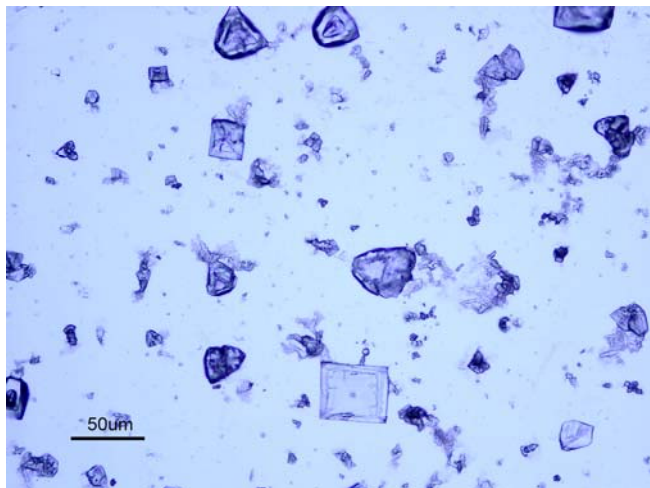
mean±S.E.M., ANOVA (LSD) test โดยตั้งค่านัยสำคัญที่ค่า  $p \text{ Value} < 0.05$

## ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

ผลของสารสกัดพรมมิ และสารสำคัญของพรมมิต่อการเสื่อมของเซลล์ประสาท และความจำบกพร่องที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์

### ผลการเตรียมเตรียมเบต้าอะไมลอยด์

จากการบ่มเบต้าอะไมลอยด์ ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C และนำเบต้าอะไมลอยด์ไปส่องดูที่กล้องจุลทรรศน์พบว่าเบต้าอะไมลอยด์นั้นได้เกาะกลุ่มกันเป็นชนิด Globular form ซึ่งยืนยันได้ว่า เบต้าอะไมลอยด์นั้นสามารถเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทได้หลังจากที่เบต้าอะไมลอยด์ที่พร้อมทำการฉีดเข้าไปใน Lateral ventricle ของสัตว์ทดลอง

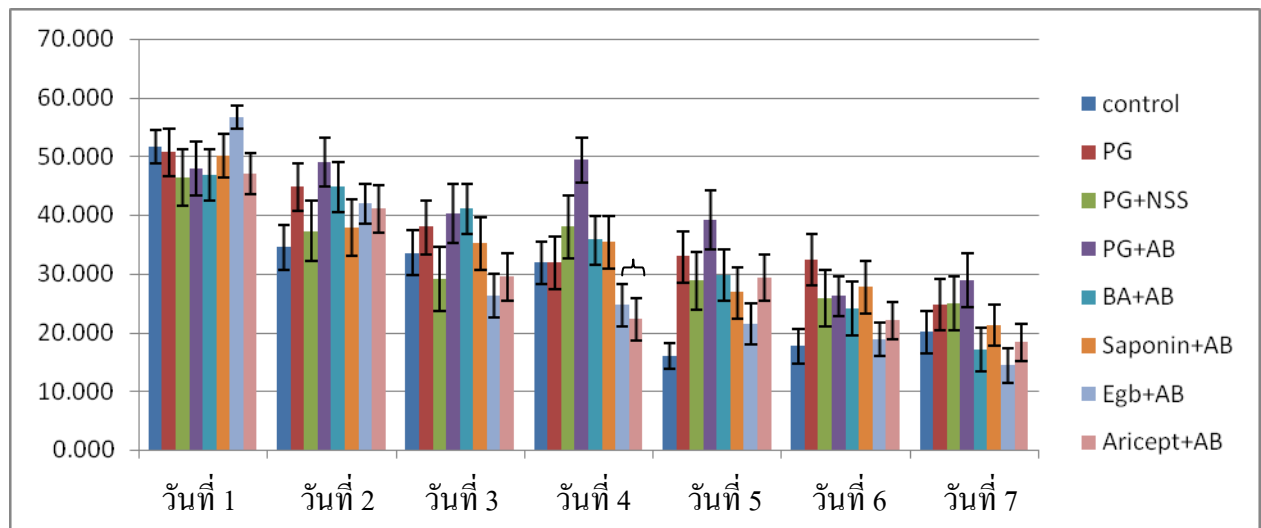


ภาพที่ 4 แสดงการเกาะกลุ่มกันของ เบต้าอะไมลอยด์ ด้วยกำลังขยาย 4x

### ผลของการวัดความจำเกี่ยวกับสถานที่ ใน Morris water maze test

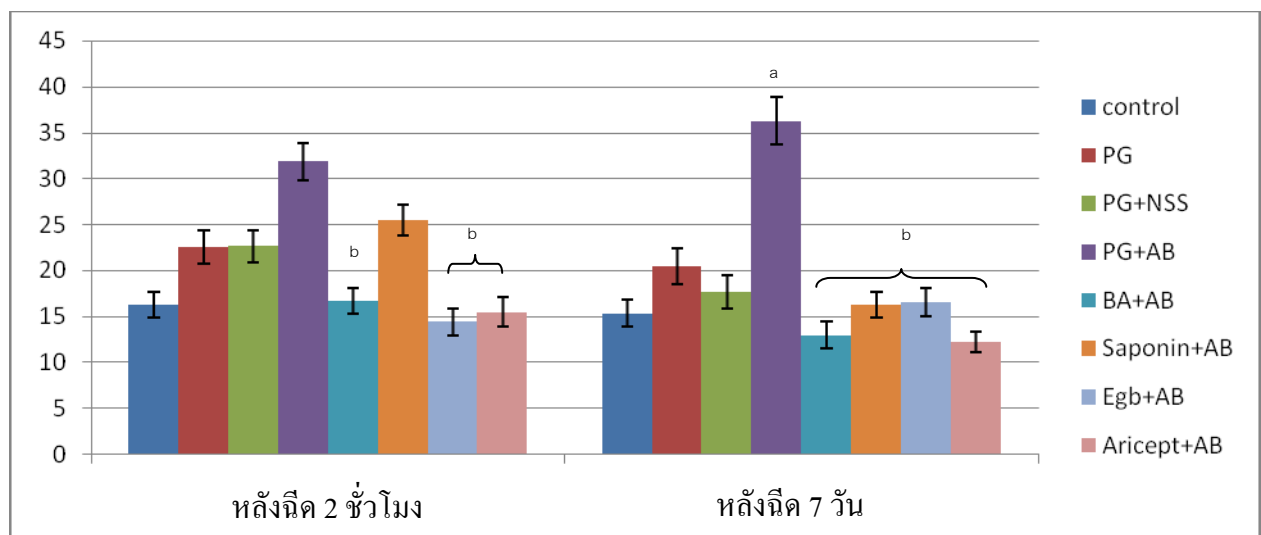
สัตว์ทดลองที่ได้รับการฝึกความจำเกี่ยวกับสถานที่เป็นเวลาทั้งสิ้น 7 วัน โดยภาพรวมพบว่าตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 นั้นสัตว์ทดลองของทุกกลุ่มมีความสามารถว่ายน้ำหาแท่นได้น้ำโดยใช้เวลาลดลงตามลำดับดังแสดง

ผลการฝึก MWMT ที่ภาพข้างด้านล่างนี้



ภาพที่ 5 แสดงกราฟการฝึกสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี MWM เป็นเวลา 7 วัน

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



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

จากภาพด้านบนพบว่าหลังการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ที่เวลา 2 ชั่วโมงนั้นพบว่ากลุ่ม Control PG และ PG+NSS ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้เหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์ประสาทมันมีใช้เวลาในการว่ายน้ำหา

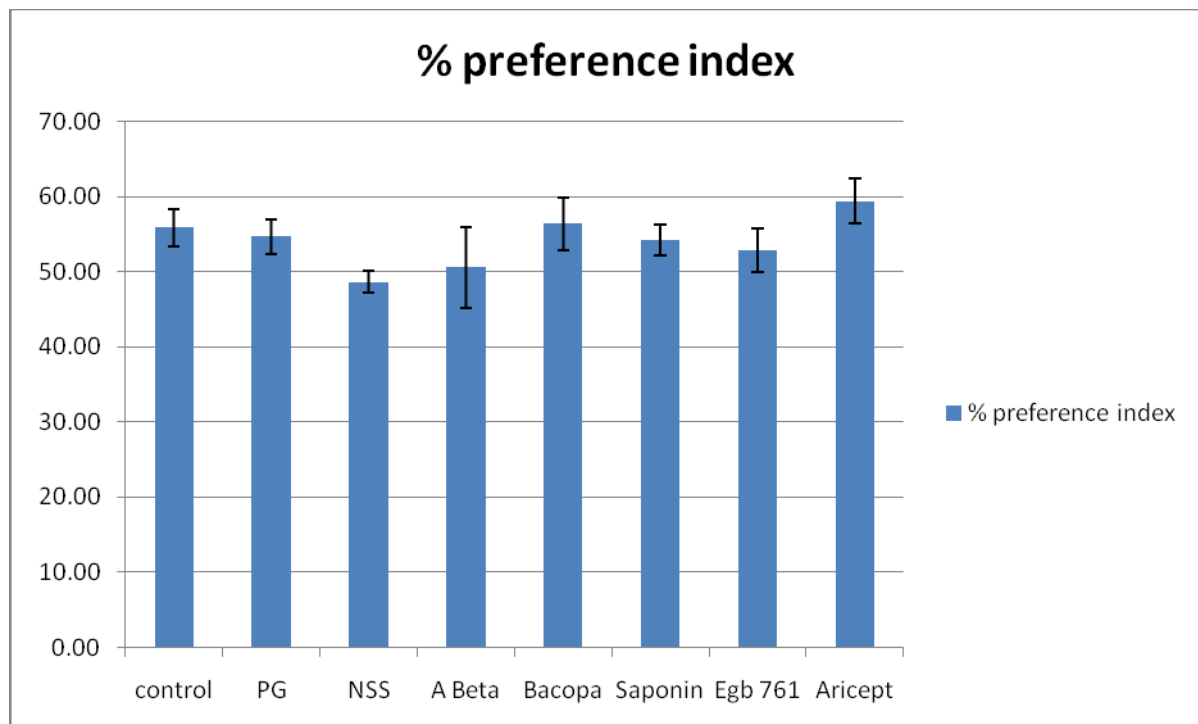


แทนได้น้ำเท่ากับ  $16.31 \pm 2.86$   $22.59 \pm 3.59$  และ  $22.67 \pm 3.47$  วินาที ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า สารละลาย PG ที่สัตว์ทดลองกิน และการฉีด NSS เข้าไปใน Lateral ventricle นั้นไม่มีผลต่อการจำและว่ายน้ำหาแทนได้น้ำเลย ในขณะที่กลุ่มสัตว์ทดลองที่รับเบต้าอะไมลอยด์ คือกลุ่ม PG+AB นั้นต้องใช้เวลาในการว่ายน้ำหาแทนได้น้ำนานที่สุด  $31.86 \pm 4.09$  วินาที แสดงให้เห็นว่า สัตว์ทดลองในกลุ่มนี้ไม่สามารถจดจำแทนได้น้ำได้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่เซลล์ประสาทได้ถูกทำลายจากการฉีด เบต้าอะไมลอยด์ และเมื่อสังเกตไปที่กลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยา หรือสารสมุนไพรควบคู่ไปกับการฉีด ด้วยเบต้าอะไมลอยด์นั้น พบว่า กลุ่มของสัตว์ทดลองที่ได้รับ พรมมิ แปะก๊วย และ Aricept นั้น สัตว์ทดลองสามารถว่ายน้ำหาแทนได้น้ำเป็นเวลาเท่ากับ  $16.70 \pm 2.693$   $14.44 \pm 2.931$  และ  $15.45 \pm 3.237$  วินาที ตามลำดับ ซึ่งเป็นเวลาที่สั้นกว่าของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+AB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) แสดงว่าสัตว์ทดลองยังสามารถจดจำแทนได้น้ำได้ดีทั้งๆ ที่ได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ ซึ่งผลที่ได้นั้นใกล้เคียงกับผลของกลุ่ม Control อีกด้วย แสดงให้เห็นว่าพรมมิ แปะก๊วย และ Aricept นั้นสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทได้

ผลของการทดสอบ MWMT หลังการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ในวันที่ 7 พบว่าหนูกลุ่ม Control PG และ PG+NSS ใช้เวลาในการว่ายน้ำหาแทนได้น้ำเท่ากับ  $15.33 \pm 2.964$   $20.44 \pm 3.891$  และ  $17.71 \pm 3.625$  วินาที ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างของใช้เวลาในการว่ายน้ำหาแทนได้น้ำเช่นเดียวกันกับผลของ MWMT หลังการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ 2 ชั่วโมง นอกจากนี้แล้วยังพบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+AB ยังใช้เวลาในการว่ายน้ำหาแทนได้น้ำนานที่สุด  $36.24 \pm 5.151$  วินาทีเช่นเดิม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของ PG+NSS นั้นพบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p \leq 0.05$  ในขณะที่ สัตว์ทดลองที่ได้รับสมุนไพรและยาได้แก่ พรมมิ Saponin แปะก๊วย และ Aricept นั้น สัตว์ทดลองสามารถว่ายน้ำหาแทนได้น้ำเป็นเวลาเท่ากับ  $12.96 \pm 2.994$   $16.26 \pm 2.757$   $16.56 \pm 3.042$  และ  $12.24 \pm 2.126$  วินาทีตามลำดับ ซึ่งเป็นเวลาที่ใกล้เคียงกันกับกลุ่ม Control PG และ PG+NSS ( $15.33 \pm 2.964$   $20.44 \pm 3.891$  และ  $17.71 \pm 3.625$  วินาที) และเมื่อเปรียบเทียบเวลาในการว่ายน้ำหาแทนได้น้ำของสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ให้ยาหรือสมุนไพรทั้ง 3 กลุ่มนี้ กับเวลาในการว่ายน้ำหาแทนได้น้ำของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+AB นั้น พบว่าหนูของทั้ง 3 กลุ่มนี้สามารถว่ายน้ำหาแทนได้น้ำได้น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p \leq 0.05$

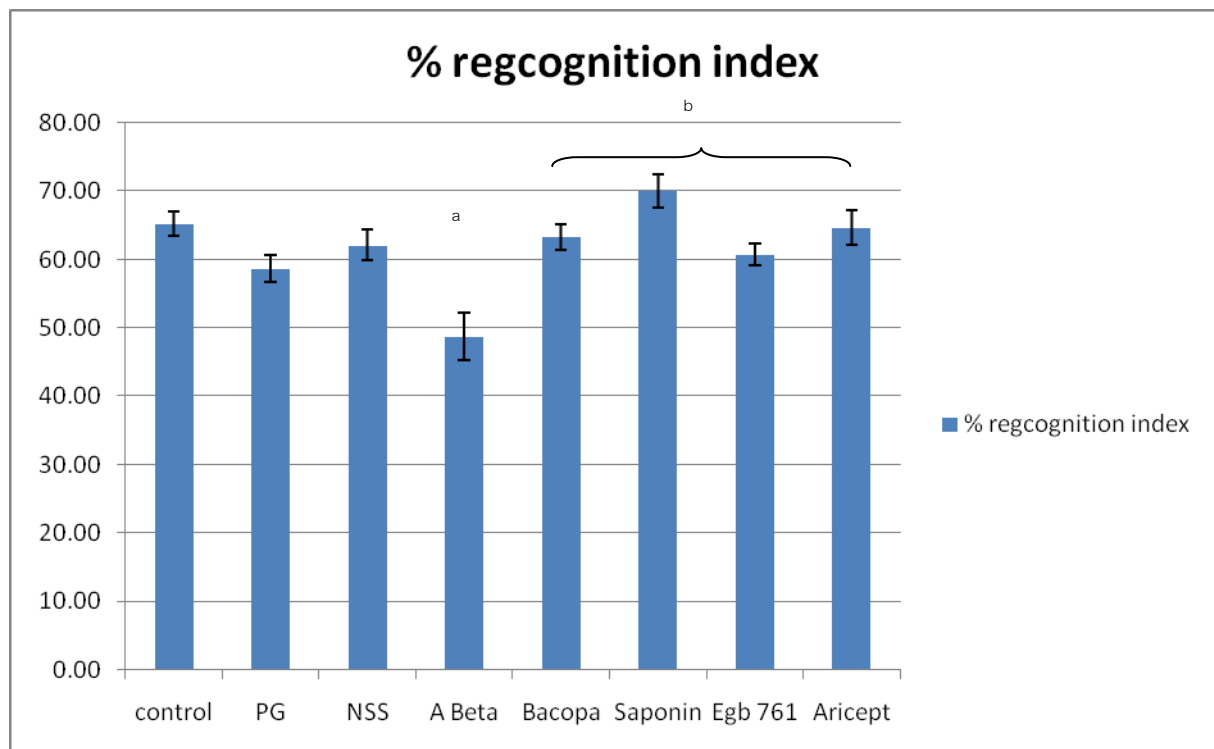
#### ผลการทดสอบ Object recognition task

ผลของเวลาที่สัตว์ทดลองใช้จำรูปหรือเข้าไปสัมผัสกับวัตถุ 2 ชนิดได้แสดงไว้ดังภาพด้านล่างนี้



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)

จากภาพด้านบนพบว่ % Preference index ของสัตว์ทดลองของกลุ่ม Control PG PG+NSS พรหมมี 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 แสดงว่าสัตว์ทดลองของทุกกลุ่มนั้นมีความชื่นชอบกับวัตถุทั้งสองสิ่งนี้พอๆกัน และเมื่อทำการเปลี่ยนวัตถุชิ้นใหม่เข้าไปแทนที่วัตถุเก่าพบว่าเวลาของการสนใจในวัตถุสิ่งใหม่ของสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มนั้นมีความแตกต่างกันดังแสดงไว้ในภาพด้านล่างนี้

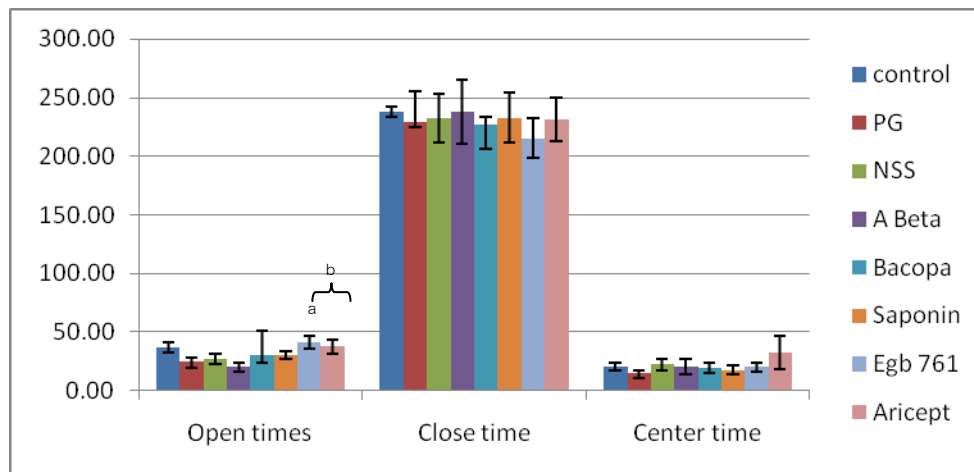


ภาพที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยของ % recognition index (mean ± S.E.M ) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี NOR (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

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

## ผลการทดสอบ EPM

เวลาที่สัตว์ทดลองเคลื่อนไหวใน Open และ Close arm ได้แสดงไว้ในภาพด้านล่างนี้



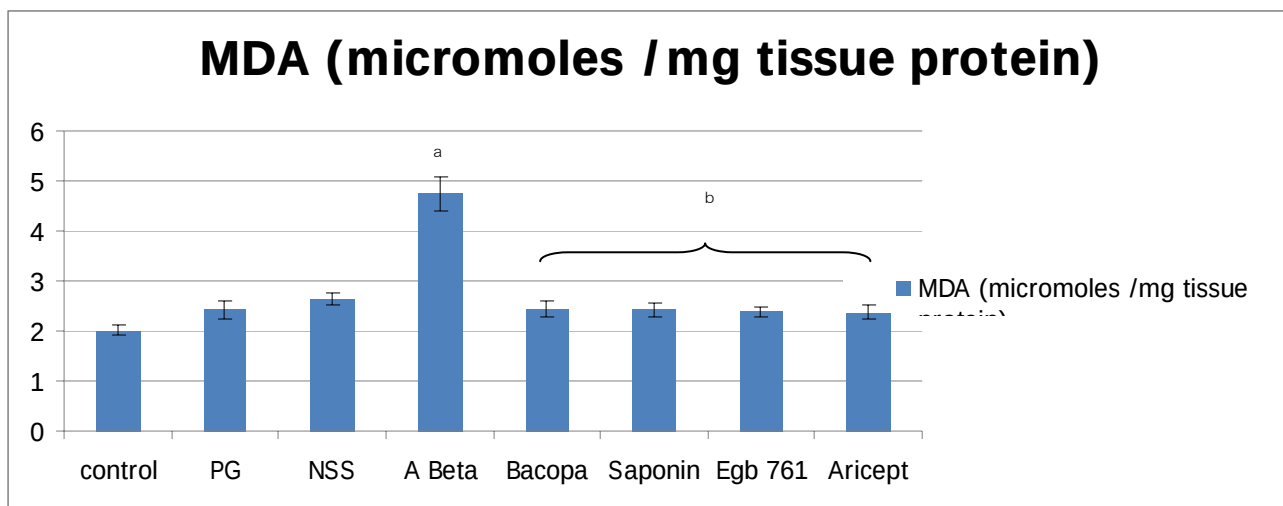
ภาพที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยของเวลาที่สัตว์ทดลองเข้าไปใน Open และ Close arm (mean  $\pm$  S.E.M ) (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

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

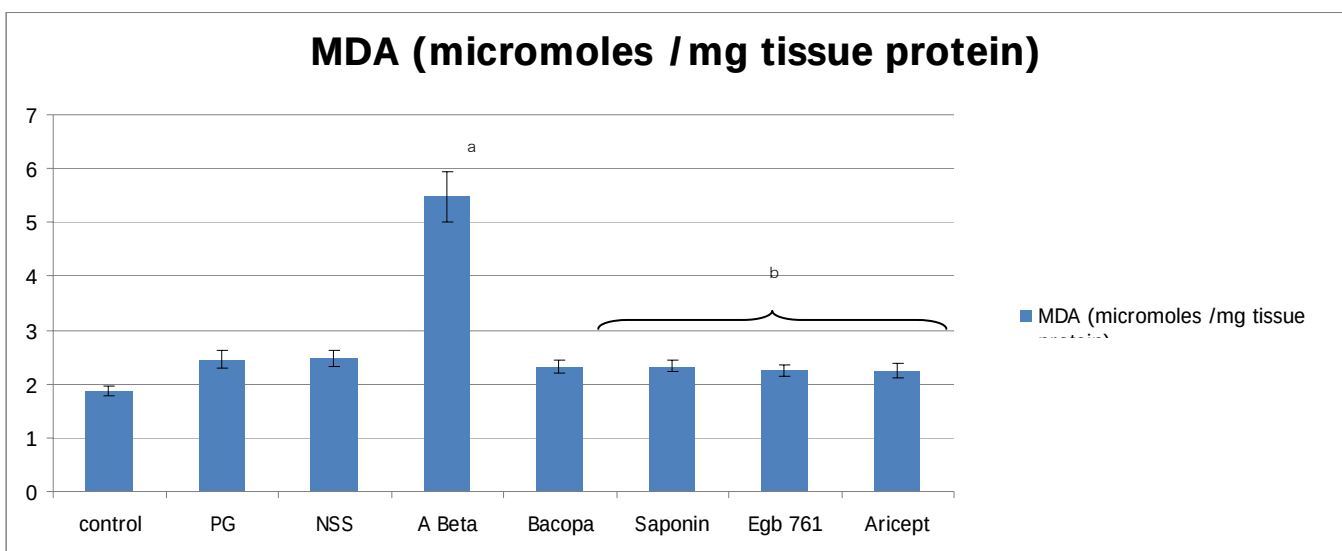
เวลาที่อยู่ใน Open arm ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG NSS PG+AB พรมมิ Saponin เปะก๊วย และ Aricept มีค่าเท่ากับ 37.17 $\pm$ 4.56 24.70 $\pm$ 3.75 27.29 $\pm$ 3.95 20.45 $\pm$ 4.04 31.02 $\pm$ 7.41 30.86 $\pm$  3.46 41.68 $\pm$ 5.716 และ 37.73 $\pm$ 6.13วินาที ตามลำดับ

## ผลการวัดระดับของ Lipid peroxidation

ระดับของ Lipid peroxidation ของสมองส่วน Cortex และ Hippocampus ของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มได้แสดงไว้ในภาพด้านล่างนี้



ภาพที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ MDA  $\mu\text{mole/mg}$  tissue proteins ในสมองส่วน Cortex (mean  $\pm$  S.E.) (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



ภาพที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ MDA  $\mu\text{mole/mg}$  tissue proteins ในสมองส่วน Hippocampus (mean  $\pm$  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  $2.02 \pm 0.10$   $2.43 \pm 0.17$  และ  $2.65 \pm 0.13$   $\mu\text{mole/mg}$  tissue proteins ตามลำดับ ในขณะที่ ระดับ MDA ของสมองส่วน Cortex ของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+AB มีค่าเท่ากับ  $4.75 \pm 0.33$   $\mu\text{mole/mg}$  tissue proteins ซึ่งมีค่า มากกว่าของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ PG+NSS ( $2.65 \pm 0.12$   $\mu\text{mole/mg}$  tissue proteins) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ระดับ MDA ของสมองส่วน Hippocampus ของสัตว์ทดลองในกลุ่ม Control PG และ NSS นั้นมีค่าเท่ากับ  $1.87 \pm 0.08$   $2.45 \pm 0.17$  และ  $2.47 \pm 0.15$   $\mu\text{mole/mg}$  tissue proteins ตามลำดับ และระดับ MDA ของสมองส่วน Hippocampus ของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+AB มีค่าเท่ากับ  $5.48 \pm 0.48$   $\mu\text{mole/mg}$  tissue proteins ซึ่งมีค่ามากกว่าของสัตว์ทดลองกลุ่มของ PG+NSS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เช่นเดียวกับของสมองส่วน Cortex

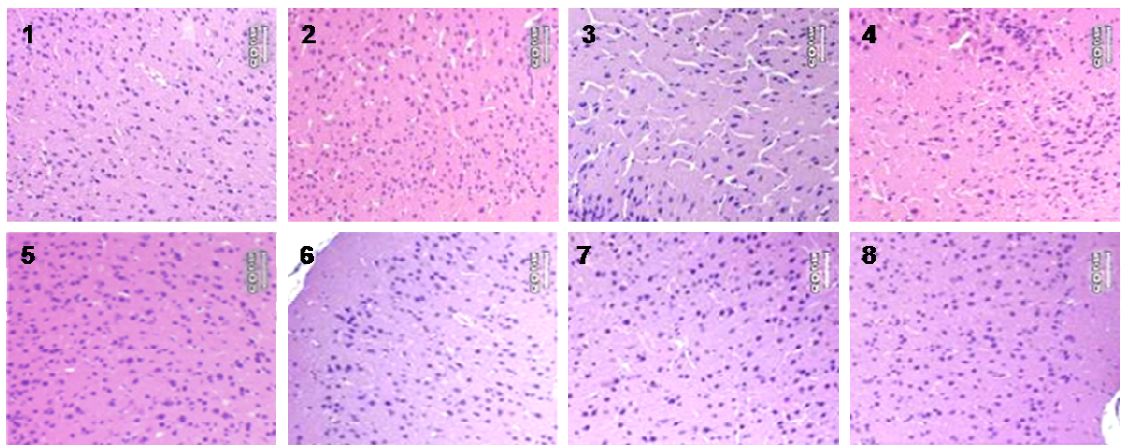
จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้เราทราบว่าการฉีดเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle สามารถทำให้ ระดับ MDA ในสมองเพิ่มขึ้นได้โดยเฉพาะสมองส่วน Cortex และ Hippocampus ในขณะที่สัตว์ทดลองได้รับยา หรือ สมุนไพรควบคู่กับการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ นั้น ระดับของ MDA ในสมองส่วน Cortex ของสัตว์ทดลองในกลุ่ม พรหมิ Saponin แปะกัวย และ Aricept มีค่าเท่ากับ  $2.45 \pm 0.17$   $2.43 \pm 0.14$   $2.38 \pm 0.10$  และ  $2.38 \pm 0.13$   $\mu\text{mole/mg}$  tissue proteins ตามลำดับ ส่วน ระดับของ MDA ในสมองส่วน Hippocampus ของสัตว์ทดลองในกลุ่ม พรหมิ Saponin แปะกัวย และ Aricept มีค่าระดับของ MDA เท่ากับ  $2.33 \pm 0.123$   $2.3 \pm 0.10$   $2.25 \pm 0.10$  และ  $2.24 \pm 0.14$   $\mu\text{mole/mg}$  tissue proteins ตามลำดับเช่นกัน ระดับของ MDA ที่สมองทั้งส่วนของ Cortex และ hippocampus ของสัตว์ทดลองที่ได้รับพรหมิ Saponin แปะกัวย และ Aricept ควบคู่กับการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ นั้นมีค่าที่น้อยกว่าของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+AB ( $4.75 \pm 0.33$   $5.48 \pm 0.48$   $\mu\text{mole/mg}$  tissue proteins) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) อีกด้วย

### ผลของพรมมิต่อการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทด้วยวิธี H&E

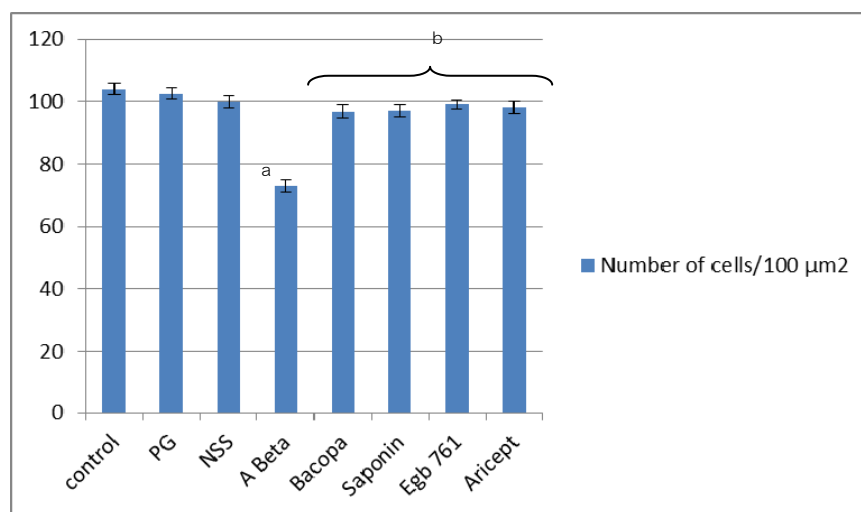
การวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการย้อมเซลล์ประสาทด้วยวิธี H&E และได้ทำการนับเซลล์ประสาทที่สมบูรณ์นั้นต้องสามารถเห็นลักษณะของเซลล์ Nucleus และ Nucleolus ที่สมบูรณ์ ซึ่งเซลล์ประสาทที่นับได้นั้นได้ถูกคำนวณเป็นร้อยละจำนวนเซลล์เพื่อเทียบกับกลุ่ม NSS

เซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 (External granular/pyramidal layer) ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ  $104.04 \pm 1.85$   $102.60 \pm 1.77$  และ  $100 \pm 2.01$  cells/ $100\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5 (external granular/pyramidal layer) มีค่า เท่ากับ  $101.99 \pm 2.64$   $100.70 \pm 1.52$  และ  $99.76 \pm 1.71$  cells/ $100\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ และชั้นที่ 6 (Poly morphic layer) มีค่า เท่ากับ  $100.35 \pm 2.19$   $101.19 \pm 2.41$  และ  $100.66 \pm 2.22$  cells/ $100\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 4/5 และ ชั้นที่ 6 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม PG+AB นั้นมีค่า เท่ากับ  $72.93 \pm 1.96$   $75.05 \pm 3.49$  และ  $75.50 \pm 2.39$  cells/ $100\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ของสัตว์ทดลองที่ได้รับการฉีดด้วย เบต้าอะไมลอยด์ นั้นมีจำนวนที่น้อยกว่า กลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองในกลุ่ม PG+NSS นั้นพบว่าจำนวนเซลล์

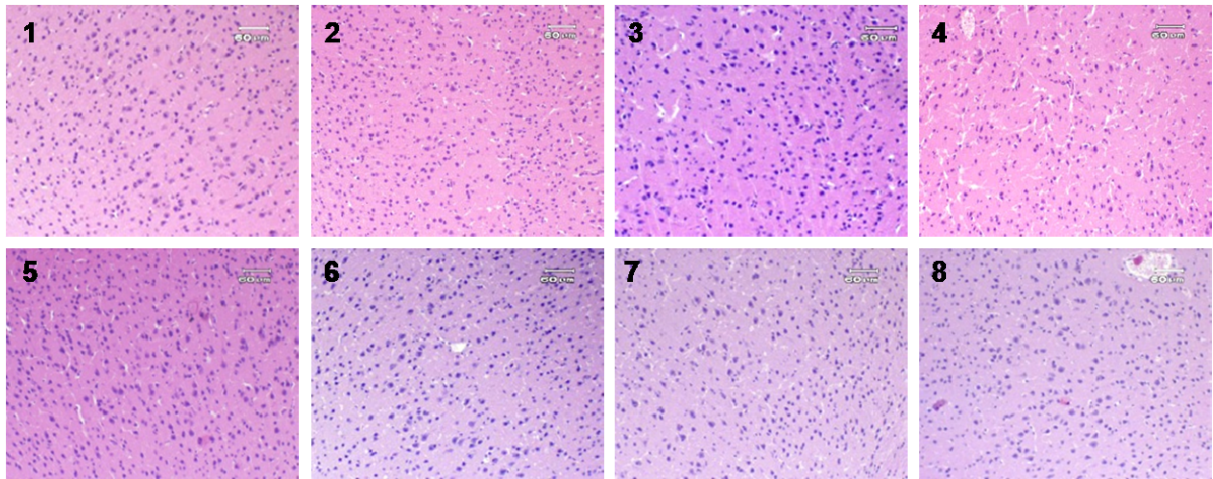
ประสาทของทุกชั้นใน Cortex มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อพิจารณาจำนวนของเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองที่ได้รับยา หรือสมุนไพรที่ควบคู่ไปกับการฉีดด้วย เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle ได้แก่ สัตว์ทดลองในกลุ่ม พรหมิ Saponin แป๊ะก๊วย และ Aricept นั้นพบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 ของสัตว์ทดลอง นั้นมีค่า เท่ากับ  $96.86 \pm 2.16$   $97.11 \pm 2.02$   $99.12 \pm 1.47$  และ  $98.07 \pm 1.89$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5 มีค่า เท่ากับ  $97.32 \pm 2.52$   $95.07 \pm 2.48$   $96.42 \pm 2.53$  และ  $97.45 \pm 2.51$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ และชั้นที่ 6 มีค่า เท่ากับ  $97.62 \pm 3.32$   $96.05 \pm 2.83$   $95.72 \pm 2.80$  และ  $95.94 \pm 2.39$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับยา หรือสมุนไพรเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+AB แล้วพบว่าจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับยา หรือสมุนไพรนั้นมีเซลล์ประสาทที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้เราทราบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับ พรหมิ Saponin แป๊ะก๊วย และ Aricept นั้นสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเบต้าอะไมลอยด์ได้



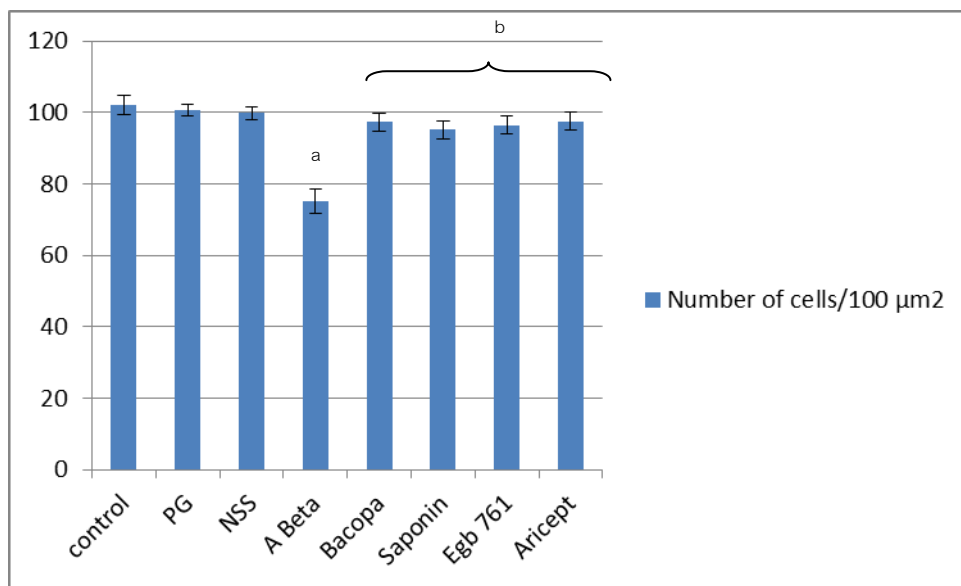
ภาพที่ 12 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 ด้วยกำลังขยาย 4x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)



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

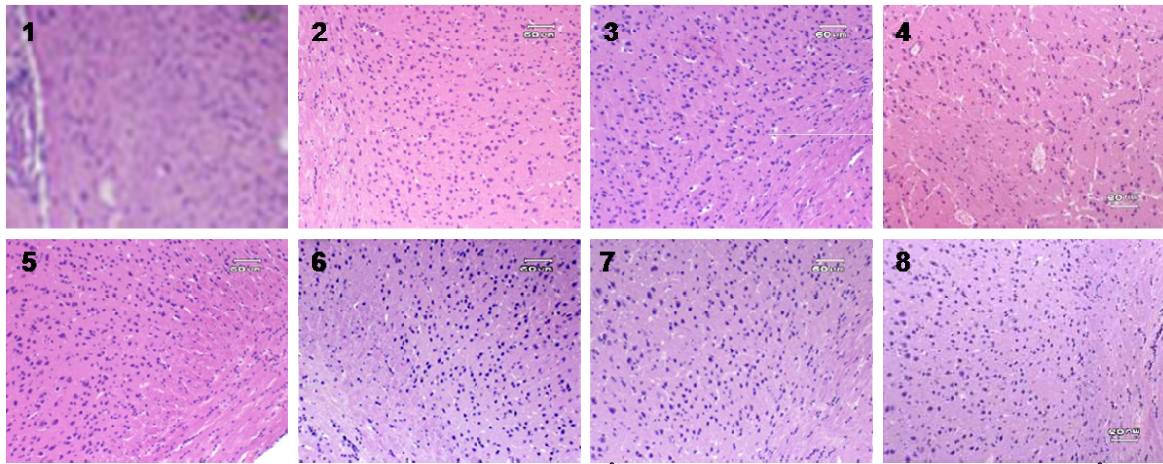


ภาพที่ 14 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 4/5 ด้วยกำลังขยาย 4x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

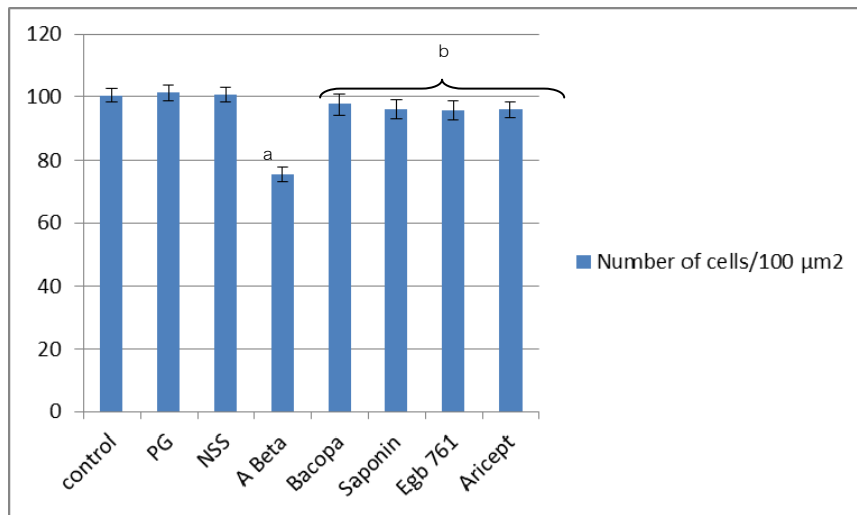


ภาพที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex บริเวณชั้นที่ 4/5 ( $a = p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ  $b = p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

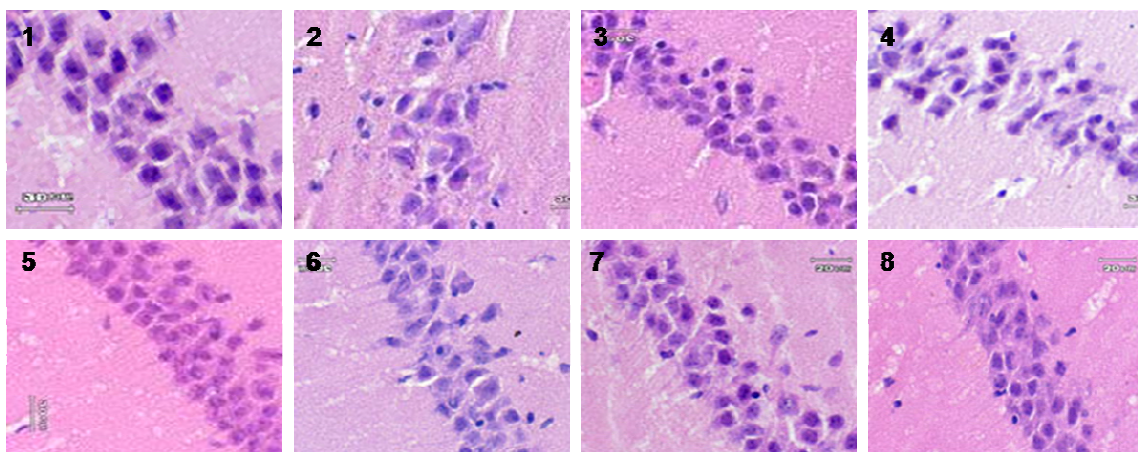




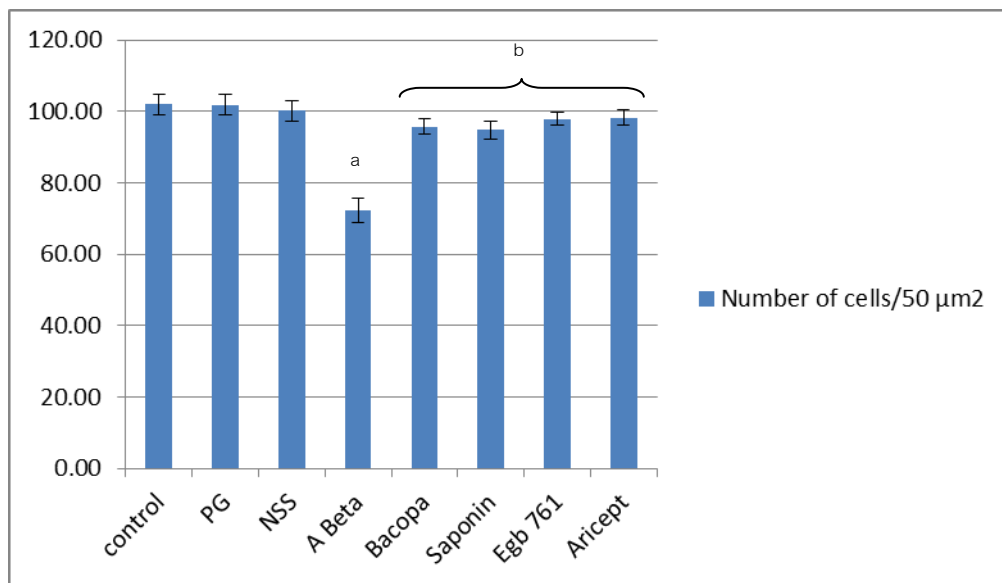
ภาพที่ 16 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 6 ด้วยกำลังขยาย 4x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)



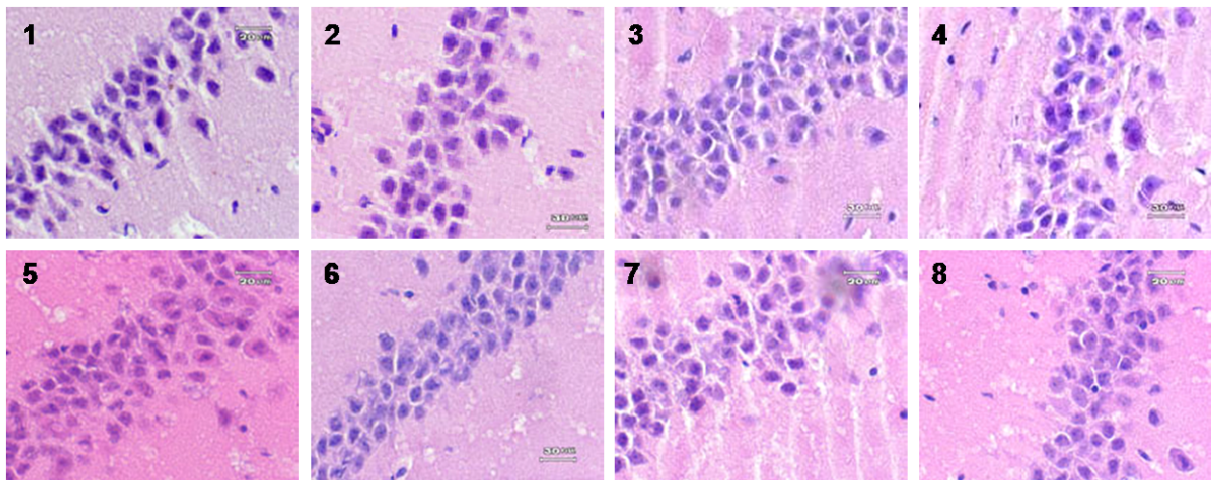
ภาพที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex บริเวณชั้นที่ 6 ( $a = p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ  $b = p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



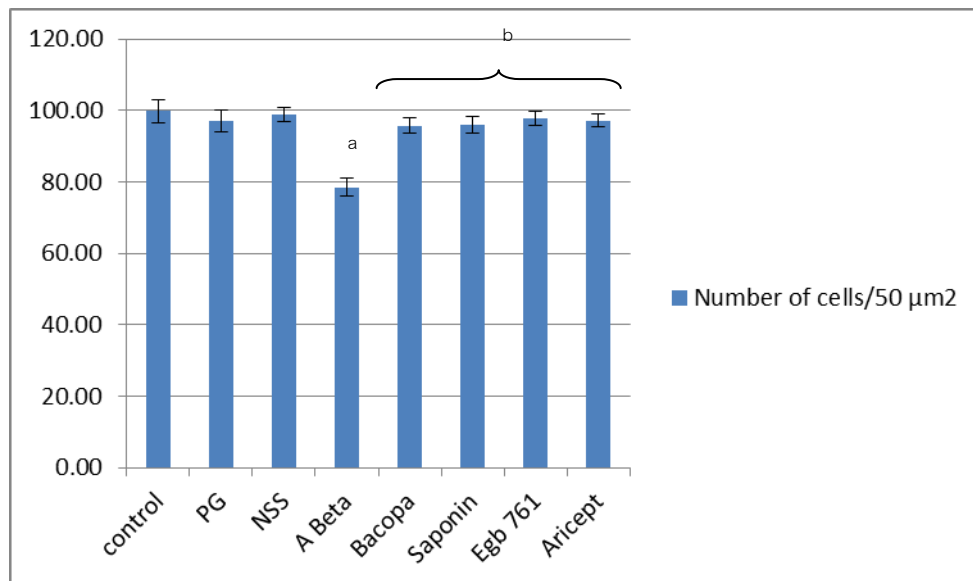
ภาพที่ 18 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 1 ด้วยกำลังขยาย 20x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)



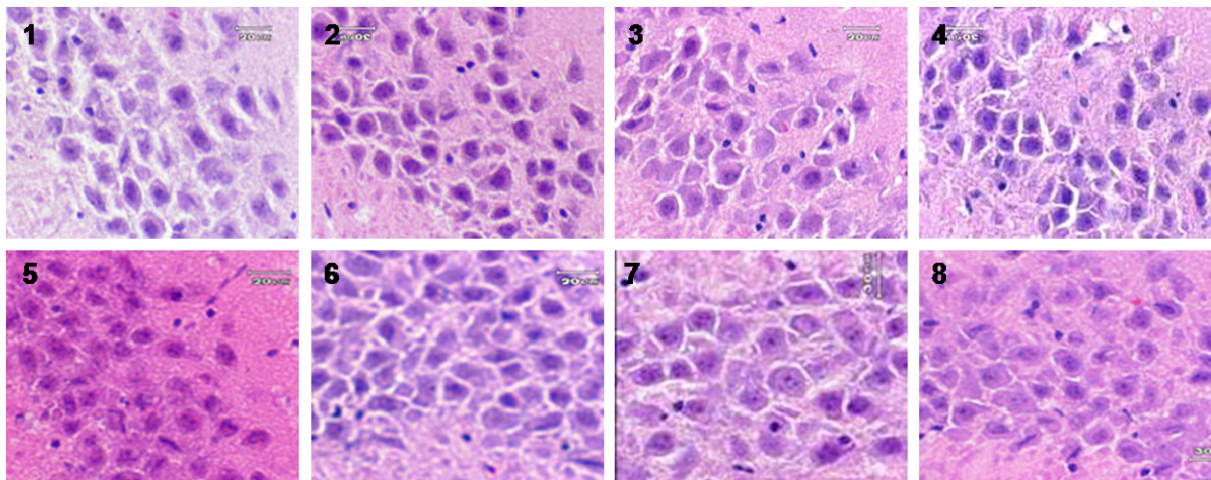
ภาพที่ 19 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b=  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



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)

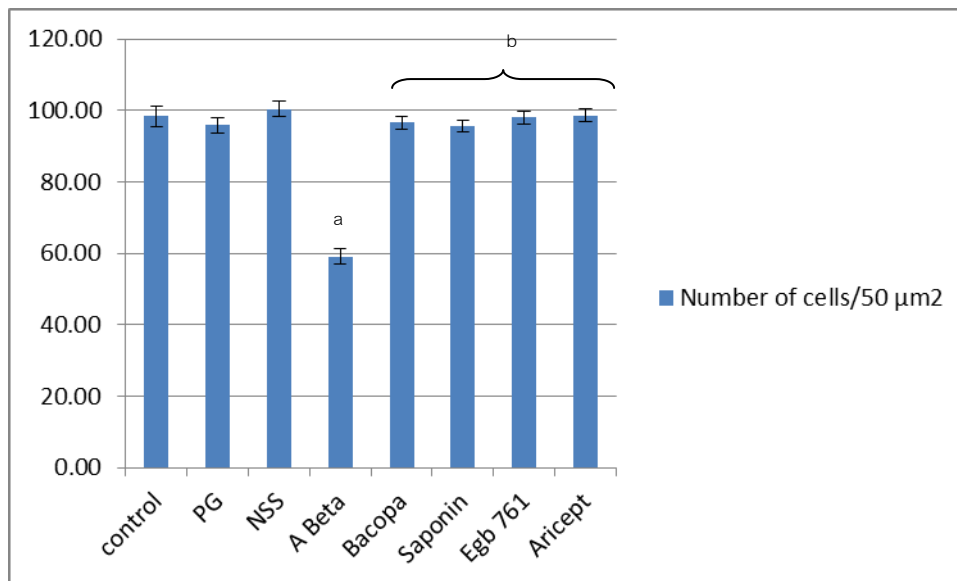


ภาพที่ 21 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA2 (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

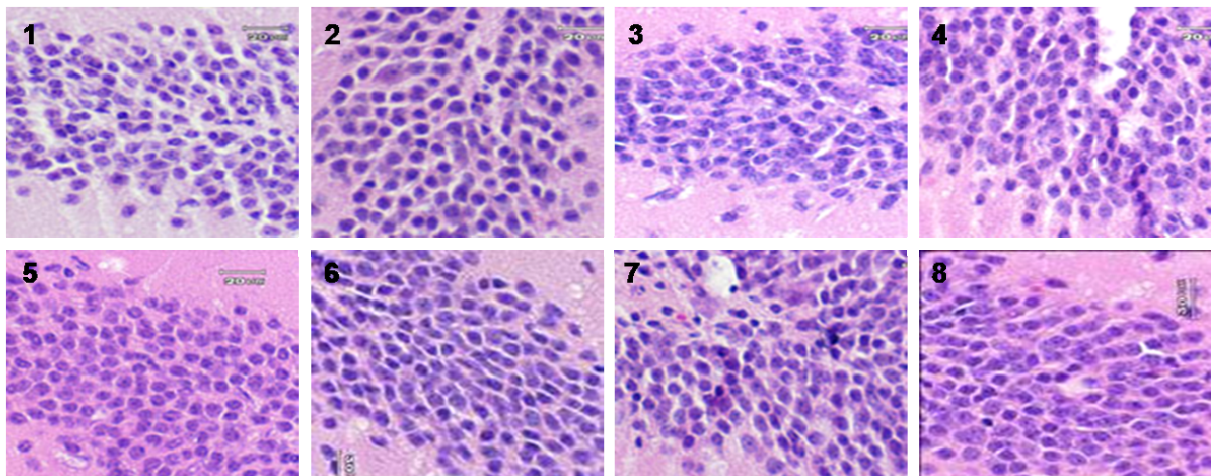


ภาพที่ 22 แสดงเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 3 ด้วยกำลังขยาย 20x ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

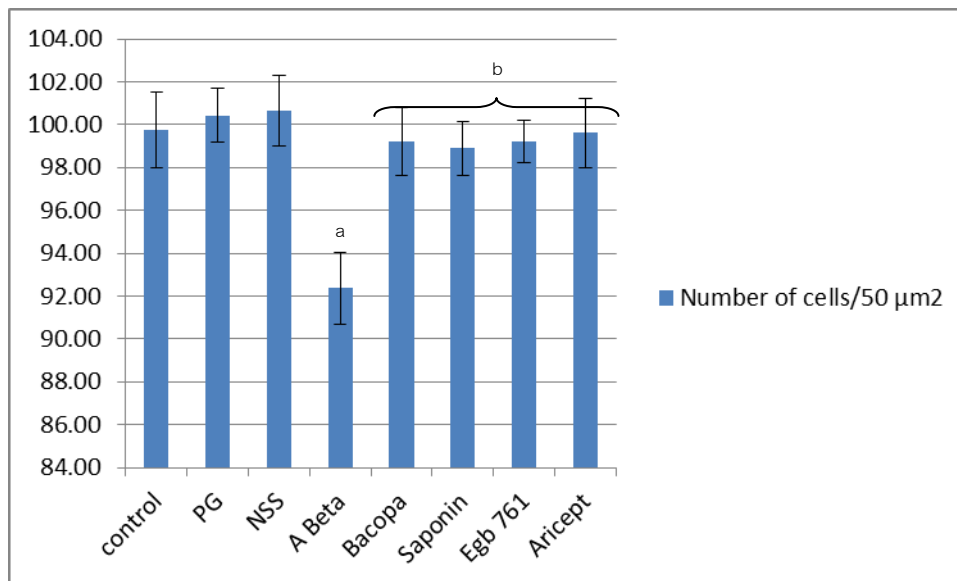




ภาพที่ 23 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA3 (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b=  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



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)

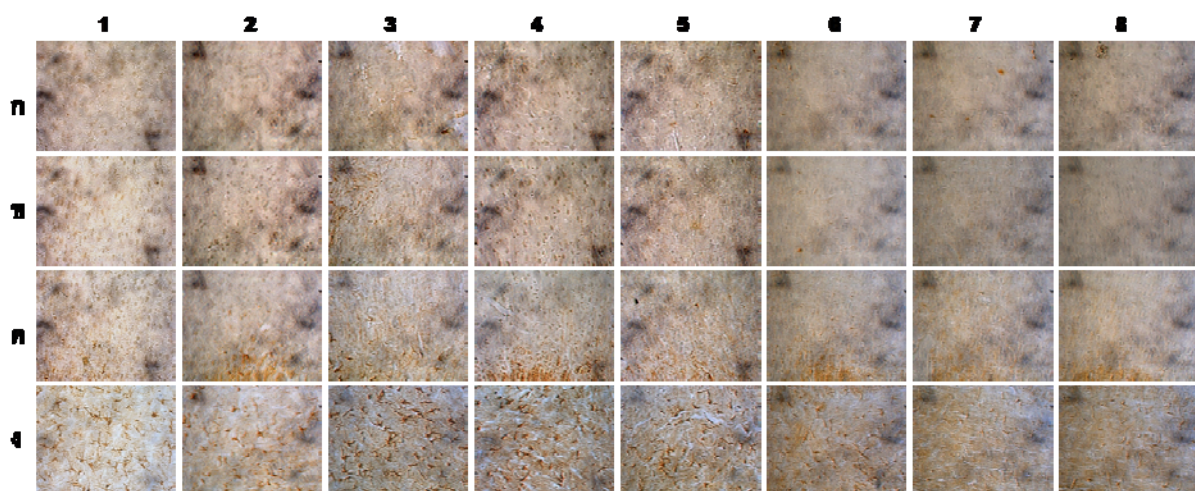


ภาพที่ 25 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณDentate gyrus (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b=  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

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

cells/50 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ และบริเวณ Dentate gyrus มีค่า เท่ากับ 99.21 $\pm$ 1.58 98.90 $\pm$ 1.25 99.20 $\pm$ 0.98 และ 99.61 $\pm$ 1.61 cells/50 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อนำจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่มดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่ม PG+AB แล้วพบว่ามันมีจำนวนเซลล์ประสาทที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ทำให้เราทราบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับ พรหมิ Saponin แปะกัวย และ Aricept นั้นสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเบต้าอะไมลอยด์ได้

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

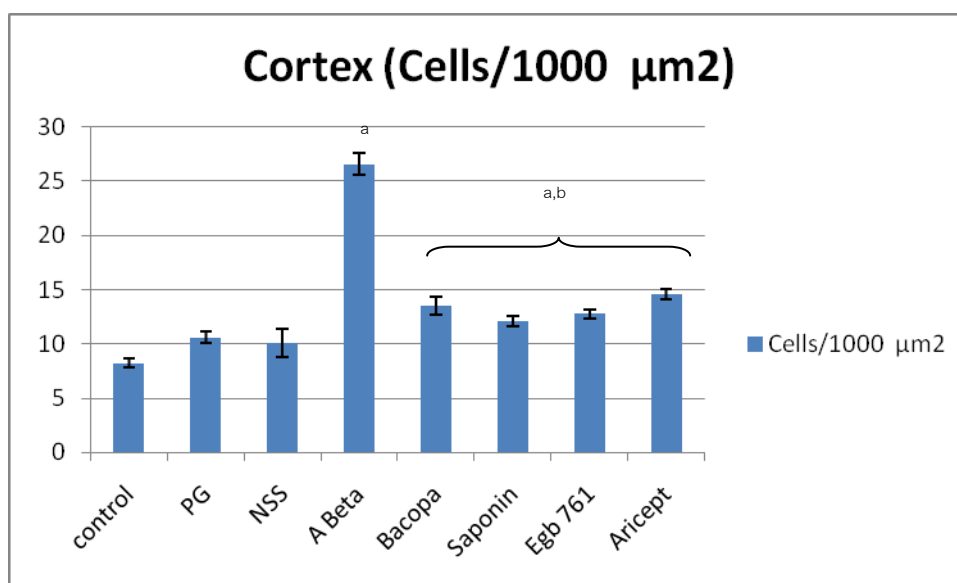


ภาพที่ 26 แสดงผลการย้อม Astrocyte ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า ภาพ ก-ค แสดง Cortical protoplasmic astrocyte สมองชั้นที่ 2/3 4/5 และ 6 ตามลำดับ ภาพ ง แสดง Cortical fibrous astrocyte ตรงบริเวณ Cingulum ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5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

หลังจากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการนับประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ในส่วน Cerebral cortex (Cells/1000  $\mu\text{m}^2$ ) ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry

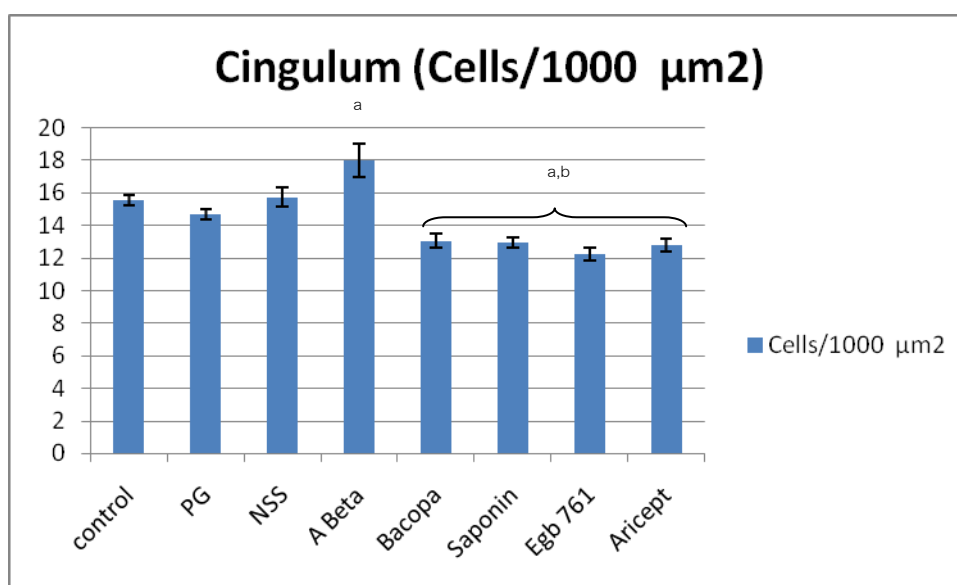
|            | Cortex      | Cingulum   |
|------------|-------------|------------|
| Control    | 8.22±0.45   | 15.56±0.33 |
| PG         | 10.58±0.51  | 14.67±0.31 |
| PG+NSS     | 10.08± 1.25 | 15.75±0.56 |
| PG+ A beta | 26.54±1.01  | 18.00±1.02 |
| Bacopa     | 13.53±0.83  | 13.07±0.43 |
| Saponin    | 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  $\pm$  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/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ ในขณะที่ จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์ มีค่า เท่ากับ 26.54±1.01 cells/100 $\mu\text{m}^2$  ซึ่งมีจำนวน Astrocyte มากกว่าประมาณ 2-3 เท่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p

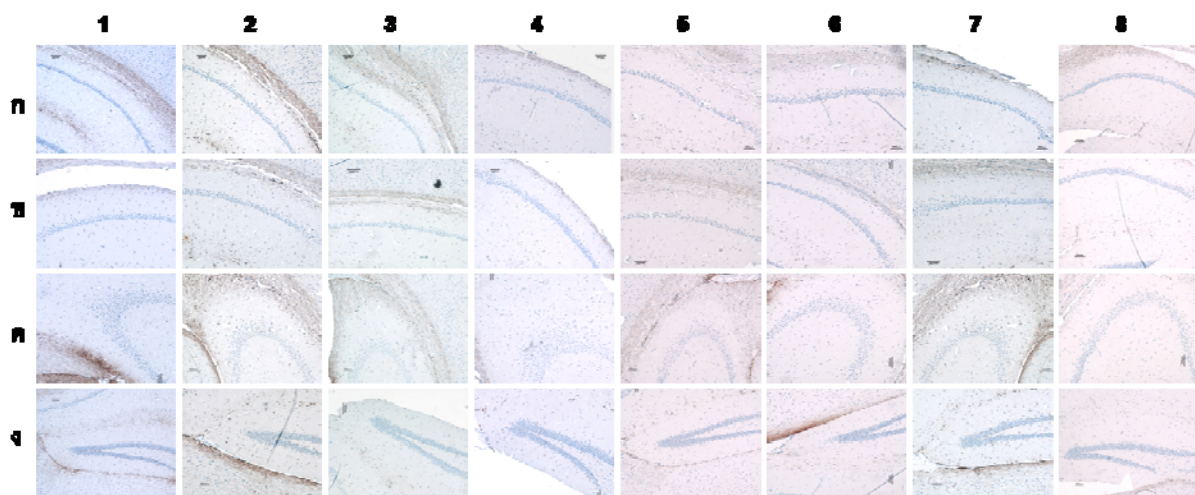
$\leq 0.05$  ) คาดว่าอาจจะเกิดจาก เบต้าอะไมลอยด์ นั้นทำลายเซลล์ประสาท (Neurons) ในสมองส่วน Cortex ทำให้มีการกระตุ้นกลไกให้มีการเพิ่มจำนวนของ Astrocytes มากขึ้น เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดพรมมิ Saponin EGb และ ยา Aricept จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Cortex มีค่าเท่ากับ  $13.53 \pm 0.83$   $12.07 \pm 0.51$   $12.78 \pm 0.41$  และ  $14.56 \pm 0.48$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ดังกล่าวกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์ รวมถึงกลุ่ม PG+NSS พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลองกลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$  )



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

ส่วนจำนวนเซลล์ประสาท Cortical fibrous astrocyte บริเวณ Cingulum ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ  $15.56 \pm 0.33$   $14.67 \pm 0.31$  และ  $15.75 \pm 0.56$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ ในขณะที่ จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์ มีค่า เท่ากับ  $18.00 \pm 1.02$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$  ) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดพรมมิ Saponin EGb และ ยา Aricept จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte มีค่าเท่ากับ  $13.07 \pm 0.43$   $12.93 \pm 0.30$   $12.22 \pm 0.40$  และ  $12.82 \pm 0.39$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์ รวมถึงกลุ่ม PG+NSS พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$  ) เช่นกัน

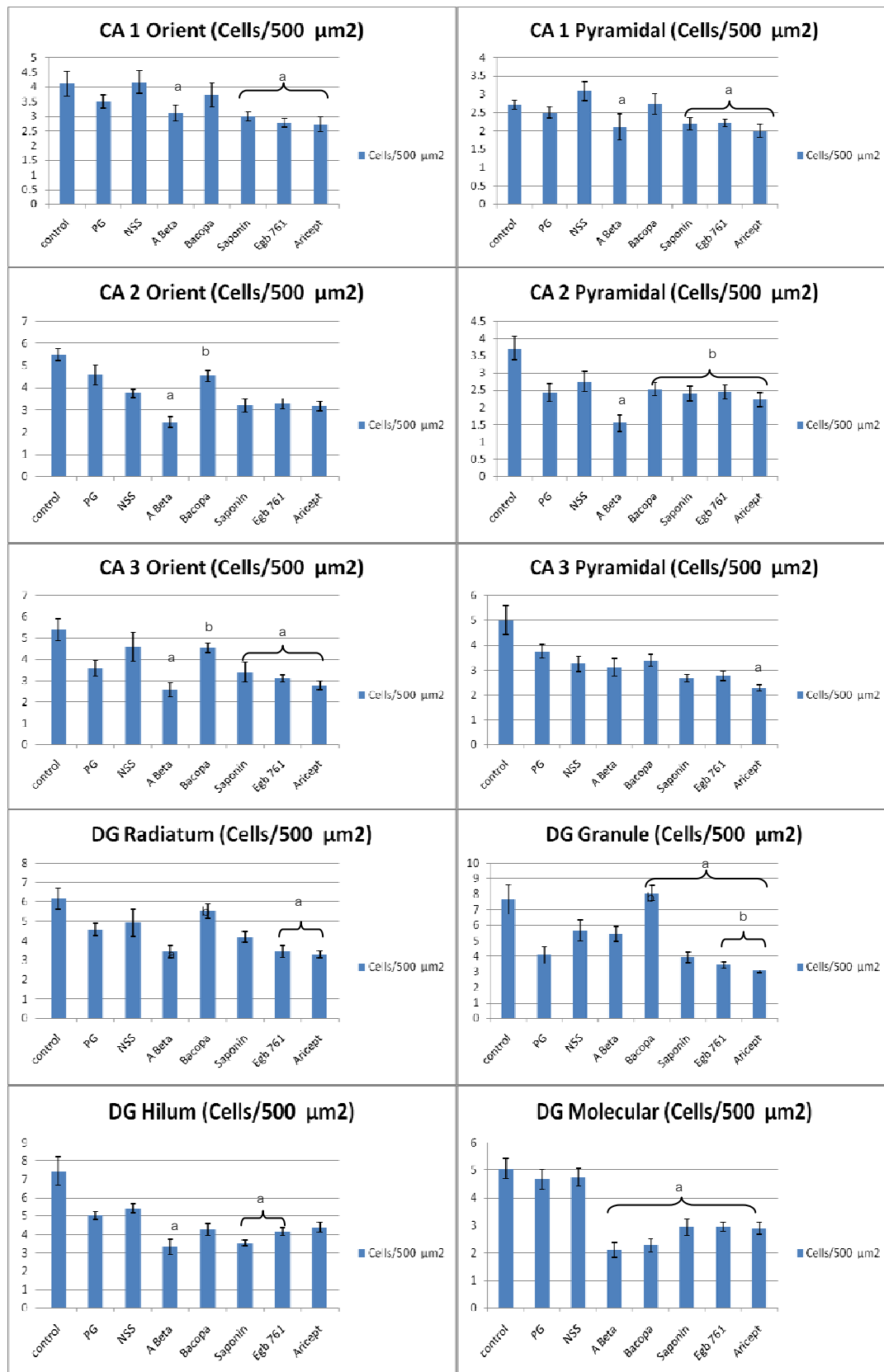




ภาพที่ 29 แสดงผลการย้อม Astrocyte ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry ด้วยกำลังขยาย 20 เท่า ภาพ ก-ง แสดง Hippocampal protoplasmic astrocyte สมองบริเวณ CA1 CA2 CA3 และ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม ตามลำดับ (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte (Cells/500 $\mu$ m<sup>2</sup>) ส่วนของHippocampus บริเวณCA1-3 ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี GFAP Immonohistochemistry

|            | CA1             |                 | CA2             |                 | CA3             |                 |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|            | Orient          | Pyramidal       | Orient          | Pyramidal       | Orient          | Pyramidal       |
| Control    | 4.11 $\pm$ 0.41 | 2.72 $\pm$ 0.13 | 5.50 $\pm$ 0.27 | 3.72 $\pm$ 0.34 | 5.39 $\pm$ 0.50 | 5.00 $\pm$ 0.58 |
| PG         | 3.50 $\pm$ 0.23 | 2.50 $\pm$ 0.15 | 4.58 $\pm$ 0.45 | 2.42 $\pm$ 0.26 | 3.58 $\pm$ 0.37 | 3.75 $\pm$ 0.27 |
| PG+NSS     | 4.17 $\pm$ 0.38 | 3.08 $\pm$ 0.26 | 3.75 $\pm$ 0.17 | 2.75 $\pm$ 0.30 | 4.58 $\pm$ 0.67 | 3.25 $\pm$ 0.30 |
| PG+ A beta | 3.11 $\pm$ 0.26 | 2.11 $\pm$ 0.35 | 2.44 $\pm$ 0.24 | 1.56 $\pm$ 0.24 | 2.56 $\pm$ 0.33 | 3.11 $\pm$ 0.35 |
| Bacopa     | 3.73 $\pm$ 0.41 | 2.73 $\pm$ 0.28 | 4.53 $\pm$ 0.25 | 2.53 $\pm$ 0.19 | 4.53 $\pm$ 0.23 | 3.40 $\pm$ 0.25 |
| Saponin    | 3.00 $\pm$ 0.16 | 2.20 $\pm$ 0.17 | 3.20 $\pm$ 0.29 | 2.40 $\pm$ 0.21 | 3.40 $\pm$ 0.47 | 2.67 $\pm$ 0.15 |
| EGb        | 2.78 $\pm$ 0.15 | 2.22 $\pm$ 0.10 | 3.28 $\pm$ 0.24 | 2.44 $\pm$ 0.20 | 3.11 $\pm$ 0.15 | 2.78 $\pm$ 0.19 |
| Aricept    | 2.72 $\pm$ 0.26 | 2.00 $\pm$ 0.18 | 3.17 $\pm$ 0.20 | 2.22 $\pm$ 0.19 | 2.78 $\pm$ 0.20 | 2.28 $\pm$ 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  $4.11 \pm 0.41$   $3.50 \pm 0.23$  และ  $4.17 \pm 0.38$  cells/500 $\mu\text{m}^2$  จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Pyramidal บริเวณ CA1 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ NSS นั้นมีค่า เท่ากับ  $2.72 \pm 0.13$   $2.50 \pm 0.15$  และ  $3.08 \pm 0.26$  cells/500 $\mu\text{m}^2$  เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีด เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle แล้ว จำนวนของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Orient และ Pyramidal บริเวณ CA1 เท่ากับ  $3.11 \pm 0.26$  และ  $2.11 \pm 0.35$  cells/500 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนที่ลดลงทำให้เราทราบว่า เบต้าอะไมลอยด์นั้นสามารถลดจำนวนของ Astrocyte ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดสมุนไพรหรือยาต่างๆ ได้แก่ พรหมิ Saponin EGb และ Aricept พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Orient บริเวณ CA1 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ  $3.73 \pm 0.41$   $3.00 \pm 0.16$   $2.78 \pm 0.15$  และ  $2.72 \pm 0.26$  cells/500 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ ส่วน จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมอง Hippocampus ชั้น Pyramidal บริเวณ CA1 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ  $2.73 \pm 0.28$   $2.20 \pm 0.17$   $2.22 \pm 0.10$  และ  $2.00 \pm 1.18$  cells/500 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดพรหมิเท่านั้นที่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาท Astrocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

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

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

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

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte (Cells/500 $\mu\text{m}^2$ ) ส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี GFAP Immunohistochemistry

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

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

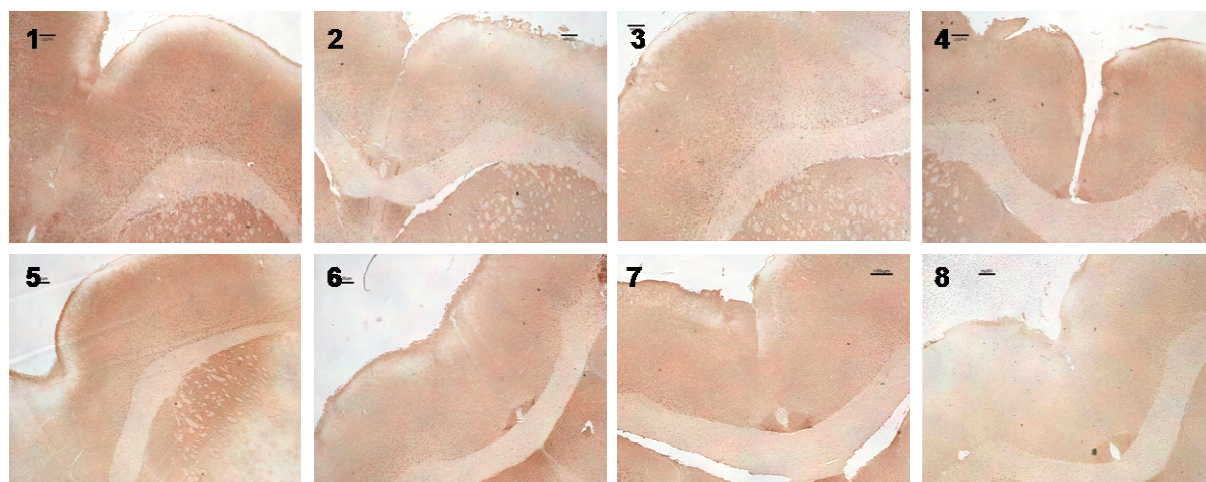
จำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Granule บริเวณ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ  $7.67 \pm 0.95$   $4.07 \pm 0.56$  และ  $5.67 \pm 0.69$  cells/500 $\mu\text{m}^2$  เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีด เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle แล้ว จำนวนของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Granule บริเวณ Dentate gyrus มีจำนวน Astrocyte เท่ากับ  $5.44 \pm 0.50$  cells/500 $\mu\text{m}^2$  นั้นมีค่าน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดสมุนไพรหรือยาต่างๆ ได้แก่ พรมมิ Saponin EGb และ Aricept พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Granule บริเวณ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Bacopa Saponin EGb และ Aricept นั้นมีค่า เท่ากับ  $8.07 \pm 0.50$   $3.93 \pm 0.33$   $3.44 \pm 0.18$  และ  $3.11 \pm 0.19$  cells/500 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ ซึ่งจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดพรมมิ เปะก๊วย 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  $7.44 \pm 0.76$   $5.00 \pm 0.21$  และ  $5.42 \pm 0.26$  cells/500 $\mu\text{m}^2$  เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีด เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle แล้ว จำนวนของเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Hilum บริเวณ Dentate gyrus มีจำนวน Astrocyte เท่ากับ  $3.33 \pm 0.40$  cells/500 $\mu\text{m}^2$  นั้นมีค่าน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดสมุนไพรหรือยาต่างๆ ได้แก่ พรมมิ Saponin EGb และ Aricept พบว่าจำนวนเซลล์ประสาท Astrocyte ของสมองส่วน Hippocampus ชั้น Hilum บริเวณ Dentate gyrus ของ

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

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

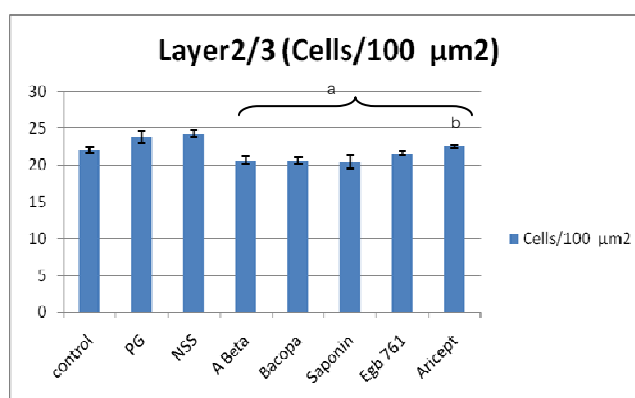
คณะผู้วิจัยยังได้ทำการวัดระดับของจำนวนโปรตีน ชนิด Amyloid precursor protein โดยใช้วิธี Immunohistochemistry ดังแสดงไว้ดังภาพ



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

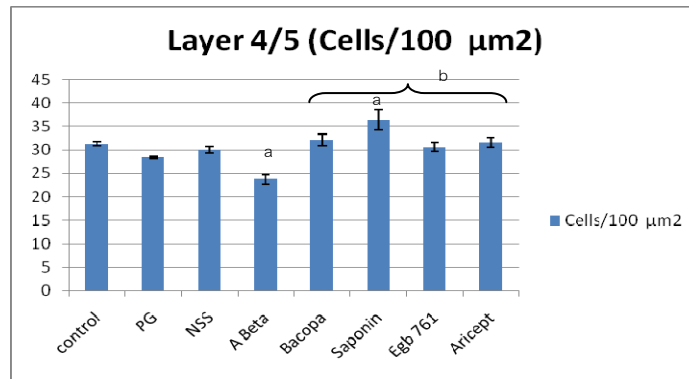
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท ใน ส่วน Cerebral cortex (Cells/100  $\mu\text{m}^2$ ) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Amyloid precursor protein Immonohistochemistry

|            | 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 |

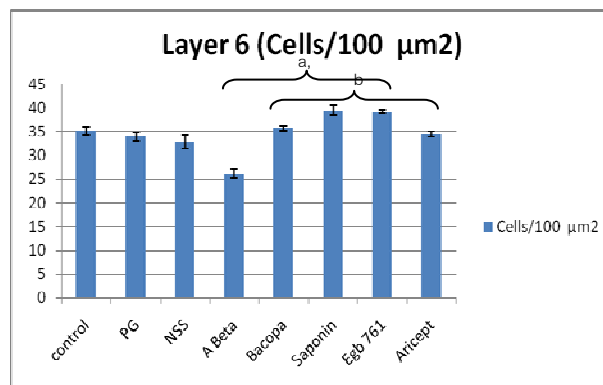


ภาพที่ 32 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)





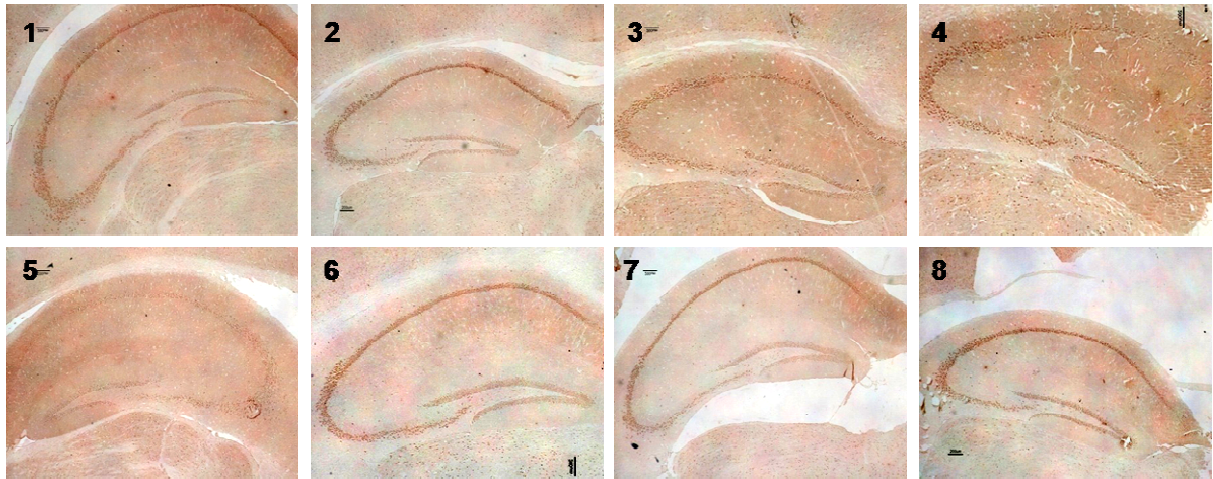
ภาพที่ 33 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 4/5 ( $a = p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ  $b = p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



ภาพที่ 34 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  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  $22.00 \pm 0.37$   $23.83 \pm 0.82$  และ  $24.25 \pm 0.47$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5 มีค่า เท่ากับ  $31.33 \pm 0.47$   $28.42 \pm 0.14$  และ  $30.08 \pm 0.73$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ และชั้นที่ 6 มีค่า เท่ากับ  $35.17 \pm 0.90$   $33.92 \pm 0.92$  และ  $32.83 \pm 1.37$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 4/5 และ ชั้นที่ 6 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม PG+AB นั้นมีค่า เท่ากับ  $20.67 \pm 0.52$   $23.78 \pm 0.98$  และ  $26.11 \pm 0.88$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ นั้นมีค่าน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสัตว์ทดลองที่ได้รับการยา หรือสมุนไพรที่ควบคู่ไปกับการฉีดด้วย เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle ได้แก่ สัตว์ทดลองในกลุ่ม พรหมิ Saponin แปะกัวย และ Aricept นั้นพบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่

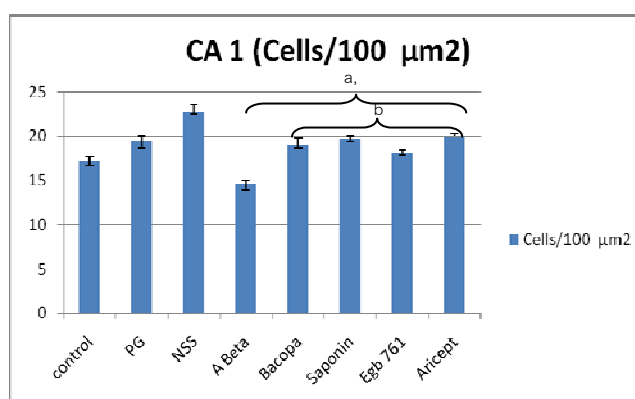
2/3 ของสัตว์ทดลอง นั้นมีค่า เท่ากับ  $20.62 \pm 0.43$   $20.47 \pm 0.89$   $21.61 \pm 0.32$  และ  $22.50 \pm 0.24$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5 มีค่า เท่ากับ  $32.13 \pm 1.20$   $36.40 \pm 2.07$   $30.61 \pm 1.01$  และ  $31.61 \pm 1.05$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ และชั้นที่ 6 มีค่า เท่ากับ  $35.67 \pm 0.49$   $39.47 \pm 0.96$   $39.28 \pm 0.37$  และ  $34.50 \pm 0.50$  cells/100 $\mu\text{m}^2$  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 ( $p \leq 0.05$ )



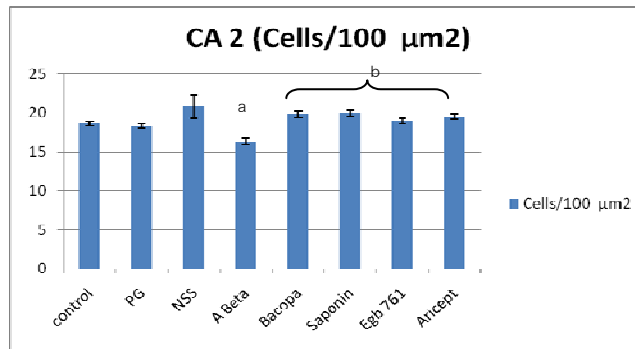
ภาพที่ 35 แสดงผลการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus ด้วยกล้องกำลังขยาย 10 เท่าของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม (1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท ใน ส่วน Hippocampus (Cells/50  $\mu\text{m}^2$ ) ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Amyloid precursor protein Immunohistochemistry

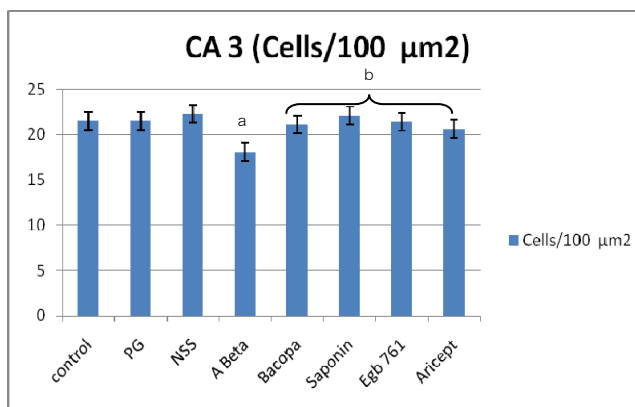
|            | CA1              | CA2              | CA3              | Dentate gyrus    |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Control    | 17.22 $\pm$ 0.44 | 18.67 $\pm$ 0.29 | 21.50 $\pm$ 0.30 | 27.39 $\pm$ 0.45 |
| PG         | 19.42 $\pm$ 0.58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



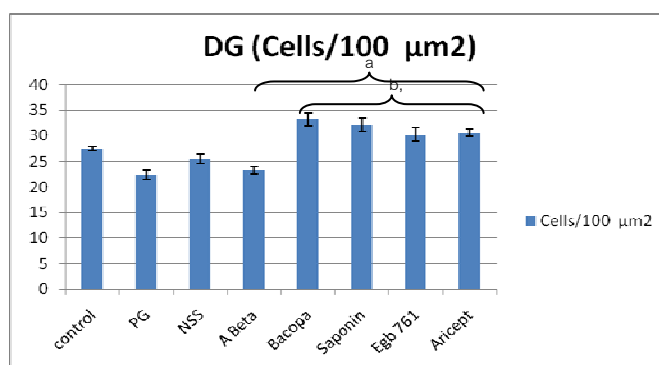
ภาพที่ 36 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 1 (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



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



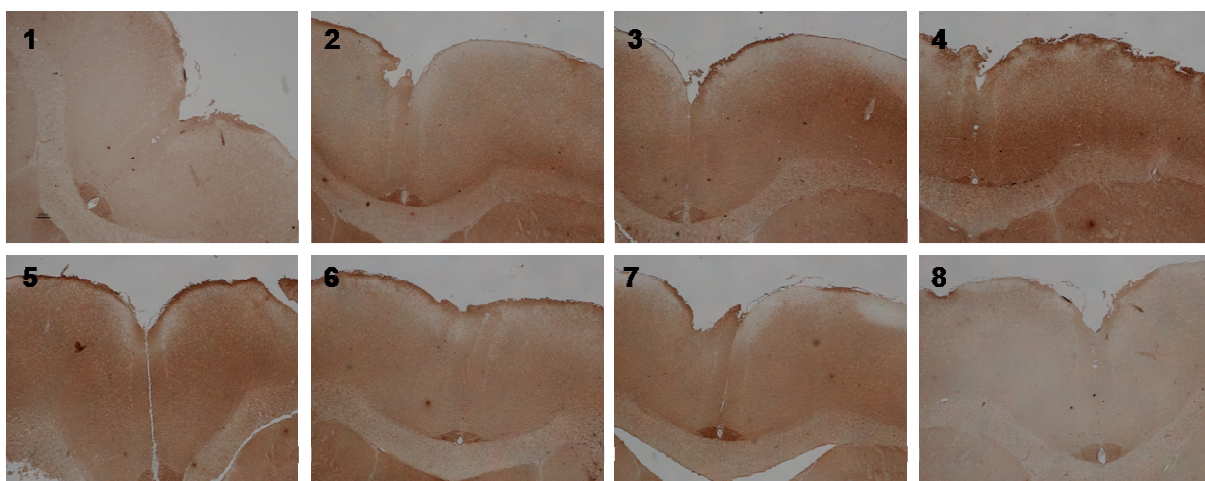
ภาพที่ 38 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 3 (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



ภาพที่ 39 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของเซลล์ประสาทจากการย้อม Amyloid precursor protein ด้วยวิธี Immunohistochemistry 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  $17.22 \pm 0.44$   $19.42 \pm 0.58$  และ  $22.83 \pm 0.80$  cells/ $50\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ บริเวณ CA2 มีค่า เท่ากับ  $18.67 \pm 0.29$   $18.33 \pm 0.31$  และ  $20.83 \pm 1.44$  cells/ $50\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ บริเวณ CA3 มีค่า เท่ากับ  $21.50 \pm 0.30$   $21.50 \pm 0.91$  และ  $22.33 \pm 1.08$  cells/ $50\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ และบริเวณ Dentate gyrus มีค่า เท่ากับ  $27.39 \pm 0.45$   $22.42 \pm 0.95$  และ  $25.58 \pm 0.90$  cells/ $50\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ เมื่อ สัตว์ทดลองได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle จำนวนเซลล์ประสาทของสมอง ส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 CA2 CA3 และ Dentate gyrus ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม PG+AB นั้นมีค่า เท่ากับ  $14.67 \pm 0.33$   $16.33 \pm 0.44$   $18.11 \pm 0.51$  และ  $23.35 \pm 0.72$  cells/ $50\mu\text{m}^2$  นั้นมีค่าน้อยลงอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสัตว์ทดลองที่ได้รับยา หรือสมุนไพรที่ควบคู่ไปกับการฉีดด้วย เบต้าอะ ไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle ได้แก่ สัตว์ทดลองในกลุ่ม พรหมมิ Saponin เปะก๊วย และ Aricept นั้นพบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ของสัตว์ทดลอง นั้นมีค่า เท่ากับ  $19.00 \pm 0.73$   $19.67 \pm 0.37$   $18.18 \pm 0.25$  และ  $20.00 \pm 0.30$  cells/ $50\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ บริเวณ CA2 มี ค่า เท่ากับ  $19.87 \pm 0.41$   $19.93 \pm 0.39$   $19.00 \pm 0.37$  และ  $19.56 \pm 0.31$  cells/ $50\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ บริเวณ CA3 มีค่า เท่ากับ  $21.13 \pm 0.29$   $22.13 \pm 0.56$   $21.44 \pm 0.46$  และ  $20.63 \pm 0.36$  cells/ $50\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ และ บริเวณ Dentate gyrus มีค่า เท่ากับ  $33.13 \pm 1.26$   $32.13 \pm 1.39$   $30.22 \pm 0.73$  และ  $30.50 \pm 0.73$  cells/ $50\mu\text{m}^2$  ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อนำจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่มดังกล่าวไป เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่ม PG+AB แล้วพบว่านั้นมีจำนวนเซลล์ประสาทที่ มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ทำให้เราทราบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับ พรหมมิ Saponin เปะก๊วย และ Aricept สามารถเพิ่มจำนวนของ Amyloid precursor protein อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

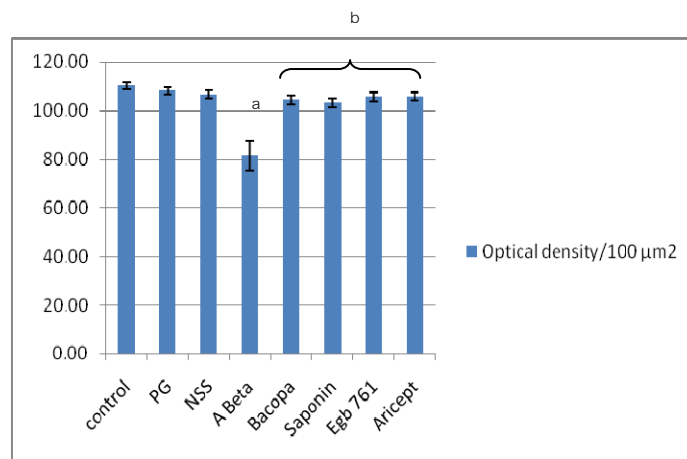
คณะผู้วิจัยยังได้ทำการวัดระดับของจำนวนโปรตีน ชนิด Beta amyloid โดยใช้วิธี Immonohistochemistry ดังแสดงไว้ดังภาพ



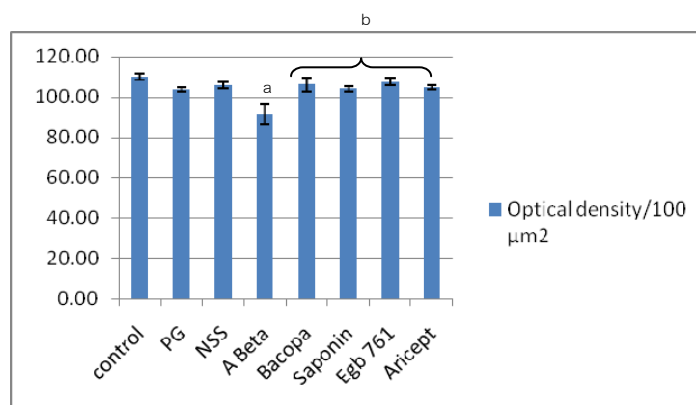
ภาพที่ 40 แสดงผลการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ด้วย กำลังขยาย 10 เท่าของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม(1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

ตารางที่ 6 แสดงผลการวัด Optical density ในพื้นที่  $100 \mu\text{m}^2$  ใน ส่วน Cerebral cortex ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Beta amyloid Immunohistochemistry

|            | 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 |

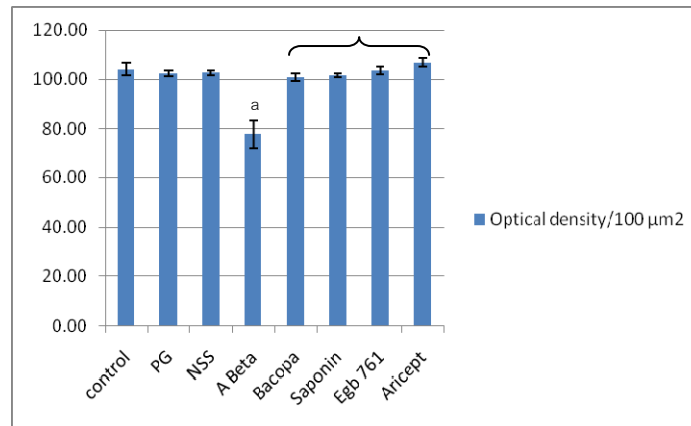


ภาพที่ 41 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



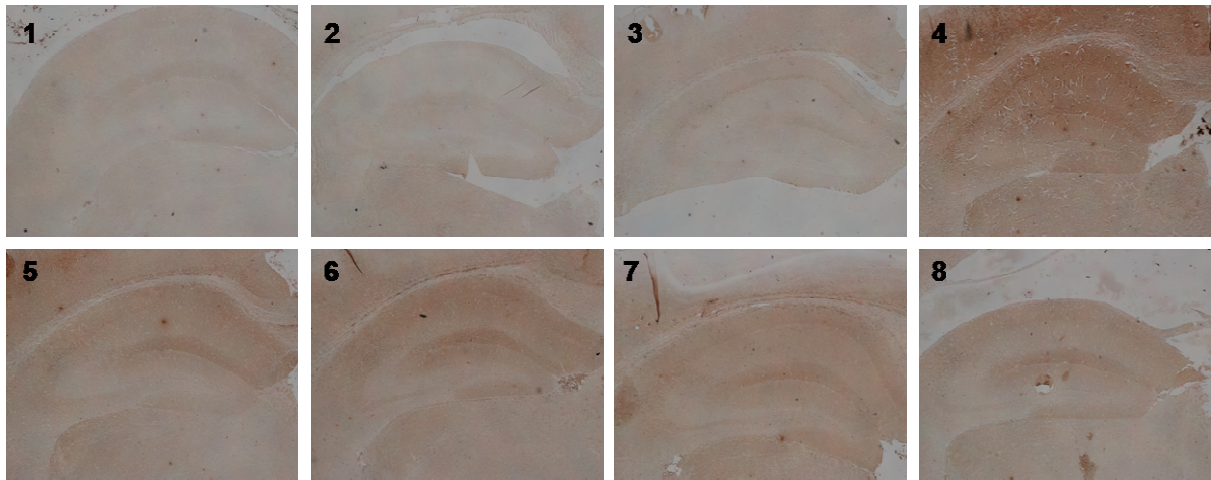
ภาพที่ 42 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 4/5 (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)





ภาพที่ 43 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  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)

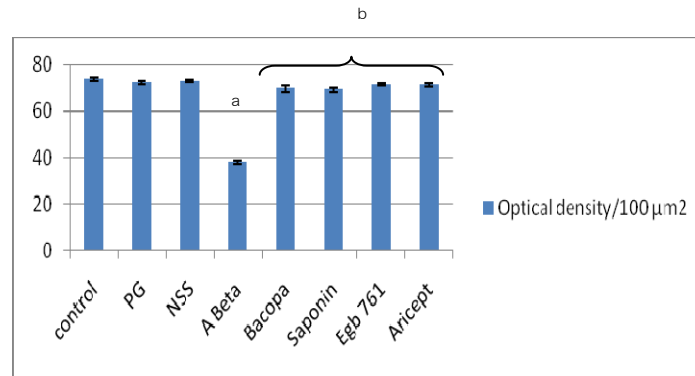
เซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 ที่ย้อมติดสีจากการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Immonohistochemistry โดยใช้ Beta amyloid antigen ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่า เท่ากับ  $110.20 \pm 1.51$   $108.11 \pm 1.47$  และ  $106.78 \pm 1.58$  ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5 มีค่า เท่ากับ  $110.15 \pm 1.71$   $103.73 \pm 1.06$  และ  $105.69 \pm 1.64$  ตามลำดับ และชั้นที่ 6 มีค่า เท่ากับ  $103.98 \pm 2.48$   $102.22 \pm 1.09$  และ  $102.53 \pm 0.84$  ตามลำดับ เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการฉีดด้วยเบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 4/5 และ ชั้นที่ 6 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม PG+AB นั้นมีค่า เท่ากับ  $81.41 \pm 6.18$   $91.37 \pm 5.07$  และ  $77.81 \pm 5.71$  ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อสัตว์ทดลองที่ได้รับยา หรือสมุนไพรที่ควบคู่ไปกับการฉีดด้วย เบต้าอะไมลอยด์เข้าไปใน Lateral ventricle ได้แก่ สัตว์ทดลองในกลุ่ม พรมมิ Saponin เปะก๊วย และ Aricept นั้นพบว่า จำนวนเซลล์ประสาทของสมองส่วน Cortex ชั้นที่ 2/3 ของสัตว์ทดลอง นั้นมีค่า เท่ากับ  $104.51 \pm 1.87$   $103.13 \pm 1.88$   $105.61 \pm 1.75$  และ  $105.83 \pm 1.50$  ตามลำดับ ชั้นที่ 4/5 มีค่า เท่ากับ  $106.11 \pm 3.30$   $104.07 \pm 1.33$   $107.59 \pm 1.69$  และ  $104.61 \pm 1.04$  ตามลำดับ และชั้นที่ 6 มีค่า เท่ากับ  $100.80 \pm 1.66$   $103.46 \pm 1.51$  และ  $106.78 \pm 1.74$  ตามลำดับ ทำให้เราทราบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับพรมมิ Saponin เปะก๊วย และ Aricept นั้นสามารถลดความเป็นพิษของเบต้าอะไมลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



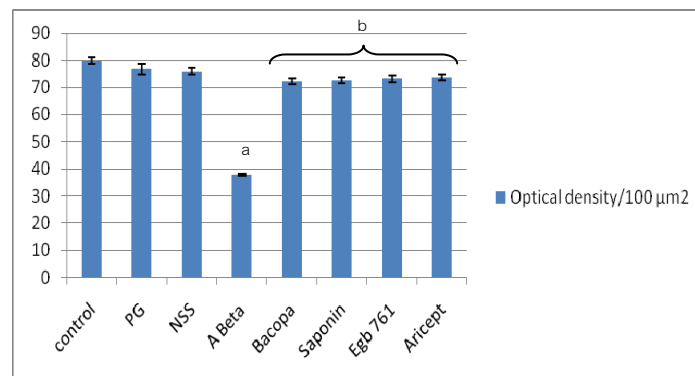
ภาพที่ 44 แสดงผลการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 1 ด้วยกำลังขยาย 1 เท่า ของสัตว์ทดลองทั้ง 8 กลุ่ม(1 control, 2 PG, 3 PG+NSS, 4 เบต้าอะไมลอยด์, 5 Bacopa, 6 Saponin, 7 EGb, 8 Aricept)

ตารางที่ 7 แสดงผลการวัด Optical density ในพื้นที่  $100 \mu\text{m}^2$  ใน ส่วน Hippocampus ของสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Beta amyloid Immunohistochemistry

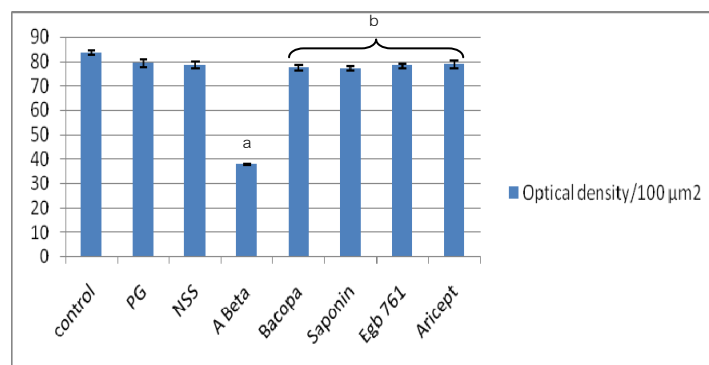
|            | CA1        | CA2        | CA3        | Dentate gyrus |
|------------|------------|------------|------------|---------------|
| Control    | 73.74±0.86 | 79.74±1.12 | 83.44±0.95 | 76.81±1.52    |
| PG         | 72.11±0.59 | 76.71±1.87 | 79.36±1.56 | 76.16±1.33    |
| PG+NSS     | 72.81±0.59 | 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    |



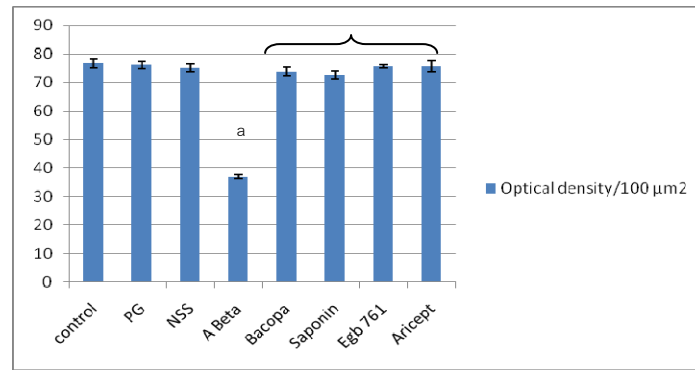
ภาพที่ 45 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immonohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA 1 (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b=  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)



ภาพที่ 46 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  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  $\pm$  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)

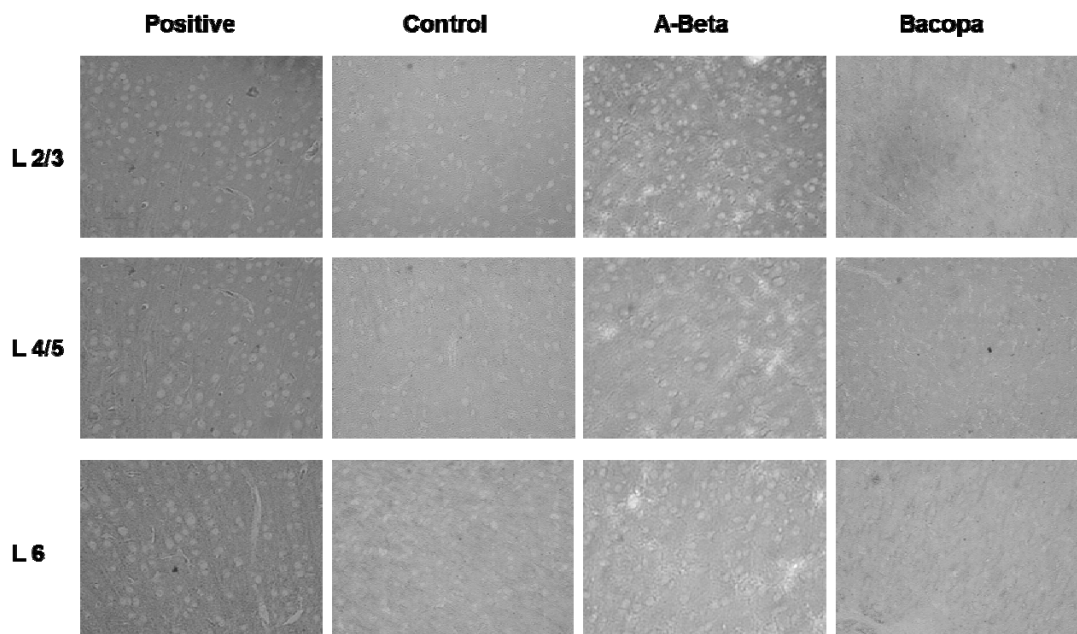


ภาพที่ 48 แสดงค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  S.E.) ของ Optical density ของการย้อม Beta amyloid ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ Dentate gyrus (a =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG+NSS และ b =  $p \leq 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม เบต้าอะไมลอยด์)

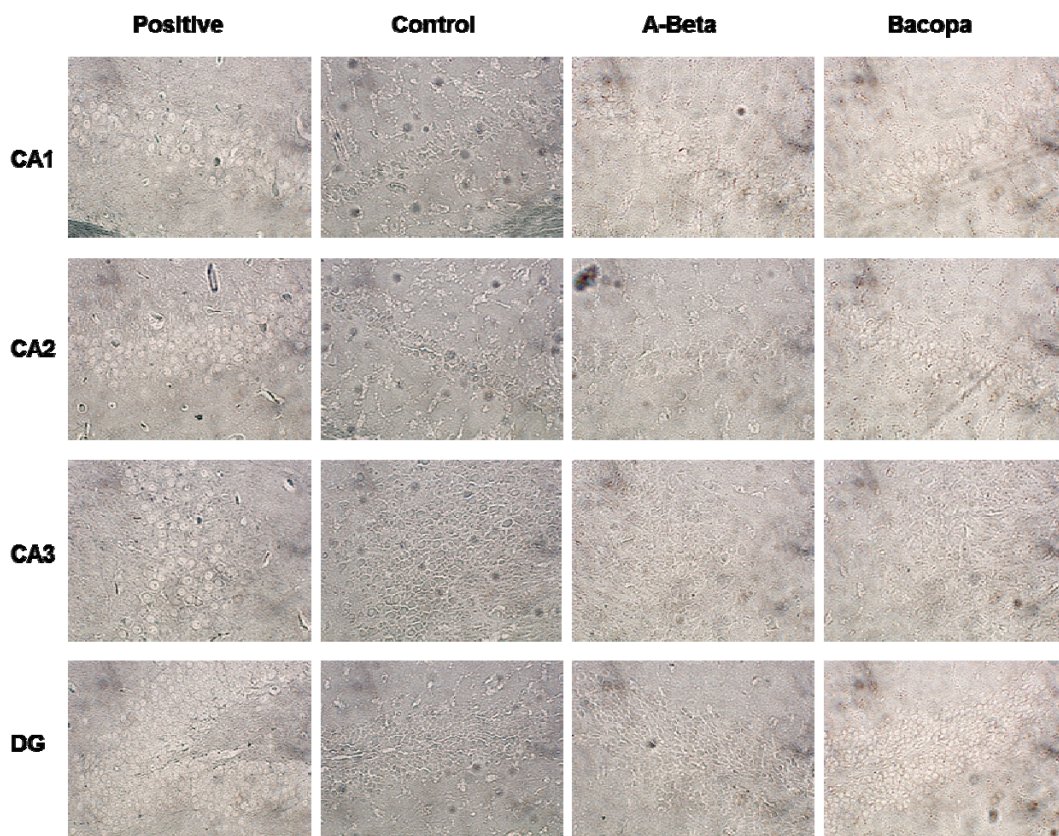
จำนวนเซลล์ประสาทที่ย้อมติดสีจากการย้อมเซลล์ ด้วยวิธี Beta amyloid ด้วยวิธี Immunohistochemistry ของสมองส่วน Hippocampus บริเวณ CA1 ของสัตว์ทดลอง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS นั้นมีค่าเท่ากับ  $73.74 \pm 0.86$   $72.11 \pm 0.59$  และ  $72.81 \pm 0.59$  ตามลำดับ บริเวณ CA2 มีค่า เท่ากับ  $79.74 \pm 1.12$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



นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำการวัดระดับของLipofuscin โดยใช้วิธี Sudan Black B ดังแสดงไว้  
ดังภาพ



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 มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ภาย  
กำลังขยายขนาด 40x แล้วพบว่าสัตว์ทดลองทุกกลุ่มที่ได้รับพรมมิ Saponin แป๊ะก๊วย และ Aricept หรือ  
แม้แต่กระทั่ง กลุ่ม Control PG และ PG+NSS เองไม่สามารถมองเห็นการสะสมของ Lipofuscin ทำให้  
คณะผู้วิจัยคาดว่าเบต้าอะไมลอยด์ที่สัตว์ได้รับการฉีดเข้าไปในโพรงสมองนั้นไม่ทำให้เกิดการสะสมของ  
Lipofuscin

## สรุปผลการทดลอง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้นำเอาเบต้าอะไมลอยด์ซึ่งเป็นเปปไทด์ชนิดหนึ่งนำมาเหนี่ยวนำให้มีการเสื่อม  
ของเซลล์ประสาทโดยการฉีดเข้าไปในโพรงสมอง และศึกษาผลของสารสกัดพรมมิ, Enriched saponin,  
แป๊ะก๊วย และยา Aricept โดยให้สารต่างๆ เหล่านี้ก่อนการฉีดเบต้าอะไมลอยด์ทางปากในขนาด 40 6.67  
100 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมตามลำดับ หลังจากนั้นคณะผู้วิจัย ได้ประเมินพฤติกรรม  
การเรียนรู้และความจำด้วยเทคนิค MWMT และ NOR พบว่าสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไม  
ลอยด์เปปไทด์นั้นมีความจำที่ลดลง ( $p < 0.05$ ) ขณะที่ในกลุ่มของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาหรือสารสกัด  
สมุนไพรก่อนการเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ มีการเพิ่มการเรียนรู้และความจำใกล้เคียงกับกลุ่ม  
ควบคุมที่ไม่ได้ให้เบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ ส่วนผลของสารสกัดพรมมิต่อระดับการเกิด Lipid peroxidation  
พบว่าสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์นั้นมีระดับของ Lipid peroxidation เพิ่มขึ้น  
เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาหรือสารสกัดสมุนไพรก่อนการเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไม  
ลอยด์เปปไทด์ นอกจากนี้คณะผู้วิจัย ยังได้ศึกษาผลของยาและสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวต่อการ  
เปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของสมองโดยดูผลทาง Histology โดยวิธี H&E และ Immunohistochemistry  
โดยใช้ GFAP, APP, A- $\beta$  antibodies ผลการวิจัยพบว่าสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าอะไมลอยด์  
เปปไทด์นั้นเซลล์ประสาทถูกเหนี่ยวนำให้มีการเสียหายมากขึ้น ( $p < 0.05$ ) ส่วนกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยา  
หรือสารสกัดสมุนไพรก่อนได้รับเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ พบมีจำนวนเซลล์ประสาทที่เสียหายลดลงเมื่อ  
เทียบกับกลุ่มที่ได้รับเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์ ( $p < 0.05$ ) ผลการวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดพรมมิ  
สามารถป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเบต้าอะไมลอยด์เปปไทด์และให้ผลใกล้เคียง  
กันกับยา Aricept และสมุนไพรแป๊ะก๊วย ดังนั้นสารสกัดพรมมิน่าจะถูกนำมาพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจที่  
นำมาใช้เป็นอาหารเสริมในการป้องกันและรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียความจำได้

## บรรณานุกรม

- Anbarasi, K., Vani, G., Balakrishna, K. and Devi, C. S. S. (2006). Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sciences*, 78(12), 1378-1384.
- Aucoin, J. S. Jiang, P. Aznavour, N. Tong, X. K. Buttini, M. Descarries, L., et al. (2005). Selective cholinergic denervation, independent from oxidative stress, in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 132(1), 73-86.
- Bhattacharya, S. K., Bhattacharya, A., Kumar, A. and Ghosal, S. (2000). Antioxidant activity of *Bacopa monnieri* in rat frontal cortex, striatum and hippocampus. *Phytother Res*, 14(3), 174-179.
- Butterfield, A. D., Castegna, A., Lauderback, C. M. and Drake, J. (2002). Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 655-664.
- Butterfield, D. A. and Bush, A. I. (2004). Alzheimer's amyloid [beta]-peptide (1-42): involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity properties of this peptide. *Neurobiology of Aging*, 25(5), 563-568.
- Butterfield, D. A., Drake, J., Pocernich, C. and Castegna, A. (2001). Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid [beta]-peptide. *Trends in Molecular Medicine*, 7(12), 548-554.
- Butterfield, D. A. Howard, B. Yatin, S. Koppal, T. Drake, J. Hensley, K., et al. (1999). Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. *Life Sciences*, 65(18-19), 1883-1892.
- Butterfield, D. A., Reed, T., Newman, S. F. and Sultana, R. (2007). Roles of amyloid [beta]-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(5), 658-677.
- Café, C. Torri, C. Bertorelli, L. Angeretti, N. Lucca, E. Forloni, G., et al. (1996). Oxidative stress after acute and chronic application of [beta]-amyloid fragment 25-35 in cortical cultures. *Neuroscience Letters*, 203(1), 61-65.
- Calabrese, C., Gregory, W. L., Leo, M., Kraemer, D., Bone, K. and Oken, B. (2008). Effects of a standardized *Bacopa monnieri* extract on cognitive performance, anxiety, and depression in the elderly: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Altern Complement Med*, 14(6), 707-713.
- Cardoso, S. M., Pereira, C. and Oliveira, C. R. (1999). Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2), 3-13.
- Chauhan, V. and Chauhan, A. (2006). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 13(3), 195-208.
- Christen, Y. (2004). Ginkgo biloba and neurodegenerative disorders. *Frontiers in Bioscience*, 9, 3091-3104.



- Das, A., Shanker, G., Nath, C., Pal, R., Singh, S. and Singh, H. K. (2002). A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*: Anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(4), 893-900.
- Deepak, M., Sangli, G. K., Arun, P. C. and Amit, A. (2005). Quantitative determination of the major saponin mixture bacoside A in *Bacopa monnieri* by HPLC. *Phytochemical Analysis*, 16, 24-29.
- deLuna, A. (2000). The Effects of *Ginkgo Biloba* on Learning and Memory. *Nutrition Noteworthy*, 3(1), Peer Reviewed.
- Dhawan, B. N. and Singh, H. K. (1996). Pharmacological Studies on *Bacopa Monniera*, an Ayurvedic Nootropic Agent. *European Neuropsychopharmacology*, 6(Supplement 3), 144-144.
- Dulcy, C. P. and Rajan, E. (2009). *Bacopa monniera* extract enhance the cognitive ability of rats by increasing serotonin level. *Neuroscience Research*, 65(Supplement 1), S110-S110.
- Francis, P. T., Ramírez, M. J. and Lai, M. K. (2010). Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 59(4-5), 221-229.
- Gibson, G. E. and Huang, H.-M. (2005). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 26(5), 575-578.
- Harper, A. J., Day, M., Roman, S. and Gonzalez, M. I. (2004). A novel watermaze procedure to investigate age old problems: profiling aricept by manipulating task difficulty. *Neurobiology of Aging*, 25(Supplement 2), S229-S229.
- Holcomb, L. A., Dhanasekaran, M., Hitt, A. R., Young, K. A., Riggs, M. and Manyam, B. V. (2006). *Bacopa monniera* extract reduces amyloid levels in PSAPP mice. *J Alzheimers Dis*, 9(3), 243-251.
- Hosamani, R. and Muralidhara. (2009). Neuroprotective efficacy of *Bacopa monnieri* against rotenone induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *NeuroToxicology*, 30(6), 977-985.
- Hota, S. K., Barhwal, K., Baitharu, I., Prasad, D., Singh, S. B. and Ilavazhagan, G. (2009). *Bacopa monniera* leaf extract ameliorates hypobaric hypoxia induced spatial memory impairment. *Neurobiol Dis*, 34(1), 23-39.
- Hou, C. C., Lin, S. J., Cheng, J. T. and Hsu, F. L. (2002). Bacopaside III, bacopasaponin G, and bacopasides A,B, and C from *Bacopa monniera*. *Journal of Natural Product*, 65, 1759-1763.
- Jellinger, K. A. (2007). *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*. Elsevier B.V., 1-58.
- Jyoti, A., Sethi, P. and Sharma, D. (2007). *Bacopa monniera* prevents from aluminium neurotoxicity in the cerebral cortex of rat brain. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 56-62.
- Khan, R., Krishnakumar, A. and Paulose, C. S. (2008). Decreased glutamate receptor binding and NMDA R1 gene expression in hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats: Neuroprotective role of *Bacopa monnieri* extract. *Epilepsy & Behavior*, 12(1), 54-60.
- Kishore, K. and Singh, M. (2005). Effect of bacosides, alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi), on experimental amnesia in mice. *Indian J Exp Biol*, 43(7), 640-645.

- Limpeanchob, N., Jaipan, S., Rattanakaruna, S., Phrompittayarat, W. and Ingkaninan, K. (2008). Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(1), 112-117.
- Markesbery, W. R. (1997). Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(1), 134-147.
- Moreira, P. I. Nunomura, A. Honda, K. Aliev, G. Casadesus, G. Zhu, X., et al. (2007). The key role of oxidative stress in alzheimer's disease. In G. A. Qureshi et.al S. H. Parvez (Eds.), *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders* (pp. 267-281). Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Morgan, A. and Stevens, J. (2010). Does *Bacopa monnieri* improve memory performance in older persons? Results of a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *J Altern Complement Med*, 16(7), 753-759.
- Phrompittayarata, W., Putalunc, W., Tanakad, H., Jetiyanone, K., Wittaya-areekulf, S. and Ingkaninan, K. (2007). Comparison of Various Extraction Methods of *Bacopa monnieri*.
- Prabhakar, S., Saraf, M. K., Pandhi, P. and Anand, A. (2008). *Bacopa monniera* exerts anti-amnesic effect on diazepam-induced anterograde amnesia in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 200(1), 27-37.
- Praticò, D. and Delanty, N. (2000). Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on alzheimer's disease. *The American Journal of Medicine*, 109(7), 577-585.
- Roodenrys, S., Booth, D., Bulzomi, S., Phipps, A., Micallef, C. and Smoker, J. (2002). Chronic effects of Brahmi (*Bacopa monnieri*) on human memory. *Neuropsychopharmacology*, 27(2), 279-281.
- Russo, A. and Borrelli, F. (2005). *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: an overview. *Phytomedicine*, 12(4), 305-317.
- Russo, A. and Borrelli, F. (2005). *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: an overview. *Phytomedicine*, 12(4), 305-317.
- Russo, A., Borrelli, F., Campisi, A., Acquaviva, R., Raciti, G. and Vanella, A. (2003). Nitric oxide-related toxicity in cultured astrocytes: effect of *Bacopa monniera*. *Life Sciences*, 73(12), 1517-1526.
- Sairam, K., Dorababu, M., Goel, R. K. and Bhattacharya, S. K. (2002). Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine*, 9(3), 207-211.
- Saraf, M. K., Prabhakar, S. and Anand, A. (2010). Neuroprotective effect of *Bacopa monniera* on ischemia induced brain injury. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(2), 192-197.
- Sheikh, N., Ahmad, A., Siripurapu, K. B., Kuchibhotla, V. K., Singh, S. and Palit, G. (2007). Effect of *Bacopa monniera* on stress induced changes in plasma corticosterone and brain monoamines in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 671-676.
- Singh, H. K. and Dhawan, B. N. (1982). Effect of *Bacopa monniera* Linn. (Brahmi) extract on avoidance responses in rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 5(2), 205-214.

- Singh, H. K. and Dhawan, B. N. (1997). Neuropsychopharmacological effects of the Ayurvedic nootropic bacopa monniera Linn(Brahmi) Indian Journal of Pharmacology, 29(5), S359-365
- Sivaramakrishna, C., Rao, C. V., Trimurtulu, G., Vanisree, M. and Subbaraju, G. V. (2005). Triterpenoid glycosides from Bacopa monnieri. Phytochemistry, 66(23), 2719-2728.
- Stough, C. Downey, L. A. Lloyd, J. Silber, B. Redman, S. Hutchison, C., et al. (2008). Examining the nootropic effects of a special extract of Bacopa monniera on human cognitive functioning: 90 day double-blind placebo-controlled randomized trial. Phytother Res, 22(12), 1629-1634.
- Stough, C. Lloyd, J. Clarke, J. Downey, C. W. Hutchison, T. Rodgers, P., et al. (2001). The chronic effects of an extract of Bacopa monniera (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. Psychopharmacology.
- Stough, C. Lloyd, J. Clarke, J. Downey, L. A. Hutchison, C. W. Rodgers, T., et al. (2001). The chronic effects of an extract of Bacopa monniera (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. Psychopharmacology (Berl), 156(4), 481-484.
- Tripathi, Y. B., Chaurasia, S., Tripathi, E., Upadhyay, A. and Dubey, G. P. (1996). Bacopa monniera Linn. as an antioxidant: mechanism of action. Indian J Exp Biol, 34(6), 523-526.
- Uabundit, N., Wattanathorn, J., Mucimapura, S. and Ingkaninan, K. (2010). Cognitive enhancement and neuroprotective effects of Bacopa monnieri in Alzheimer's disease model. Journal of Ethnopharmacology, 127(1), 26-31.
- Vohora, D., Pal, S. N. and Pillai, K. K. (2000). Protection from phenytoin-induced cognitive deficit by Bacopa monniera, a reputed Indian nootropic plant. Journal of Ethnopharmacology, 71(3), 383-390.
- Zhou, Y., Peng, L., Zhang, W. D. and Kong, D. Y. (2009). Effect of triterpenoid saponins from Bacopa monniera on scopolamine-induced memory impairment in mice. Planta Med, 75(6), 568-574.



**Alcoholic and saponin enriched extracts of *Bacopa monnieri* improve learning and memory in amnesia mice induced by beta amyloid peptide**

Prathan Wongtala,<sup>1</sup> Kornkanok Ingkaninan,<sup>3</sup> Samur Thanoi,<sup>1</sup> Sutisa Nudmamud-Thanoi<sup>1</sup>  
and Onrawee Khongsombat<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Faculty of Medical science, Naresuan University.

<sup>2</sup> Department of Physiology, Faculty of Medical science, Naresuan University.

<sup>3</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University.

\*Corresponding author. E-mail: onrawee@windowslive.com

**Abstract**

*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (*B. monnieri*; BM) has been used in the traditional Ayurveda for centuries. It has been suggested that an alcoholic extract of *B. monnieri* (BME) can improve learning and memory and protect cell death of cortical cell culture induced by amyloid toxicity. Triterpene saponins are major constituents of BM. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the improvement of BME and saponin enriched extract (SEE) on learning and memory in amnesia mice induced by beta amyloid ( $A\beta_{25-35}$ ) peptide. Male ICR mice were divided into 8 groups (n= 7) such as (1) control; (2) propylene glycol (PG); (3) PG and normal saline (NSS); (4) PG and  $A\beta$ ; (5) BME (40 mg/kg) and  $A\beta$ ; (6) SEE (6.67 mg/kg) and  $A\beta$ ; (7) Ginkgo biloba (100 mg/kg) and  $A\beta$  and (8) Aricept (0.2 mg/kg) and  $A\beta$ . Animals were orally given either extracts or drugs for a period of 2 weeks before and 1 week after intraventricular injection (i.c.v) of NSS or  $A\beta_{25-35}$  peptides. The Morris water maze test (MWM) and novel object recognition (NOR) were employed for testing learning, memory and cognitive functions. The results of MWM, the  $A\beta_{25-35}$  injected group showed significantly longer escape latency than that of the NSS injected group ( $p < 0.05$ ) while the mice received BME, SEE, Ginkgo biloba or aricept showed significantly shorter escape latency than the  $A\beta_{25-35}$  injected group ( $p < 0.05$ ). For NOR test, the mice received BME, SEE, Ginkgo biloba, and aricept showed significantly higher percentage of recognition index when compare to the  $A\beta_{25-35}$  injected group ( $p < 0.05$ ). Conclusion, the administration of BME could improve the learning and memory in amnesia mice induced by  $A\beta_{25-35}$  peptides as well as Ginkgo biloba and aricept. Therefore, BM could be one of nootropic supplements for those elderly people suffering from dementia such as the Alzheimer's disease.

**Keywords:** *Bacopa monnieri*, learning and memory, beta amyloid