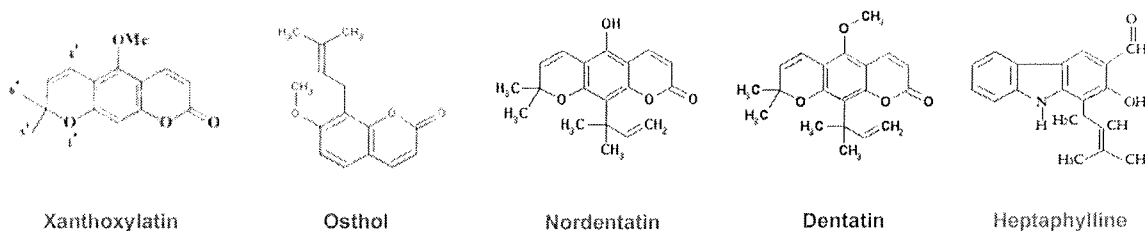


ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1 การสกัดสาร

ได้ทำการสกัดสารสำคัญจากเปลือกกรากสองฟ้าแดงมา 5 ชนิดคือ heptaphylline, dentatin, nordentatin, xanthoxyletin และ osthol โดยวิธีทาง chromatography โดยมีสูตรโครงสร้างดังรูป 2



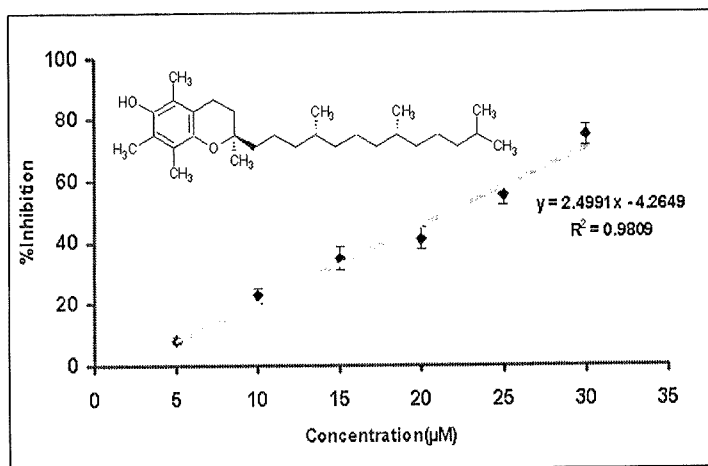
รูปที่ 2. โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดบริสุทธิ์จากต้นสองฟ้าแดง

2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

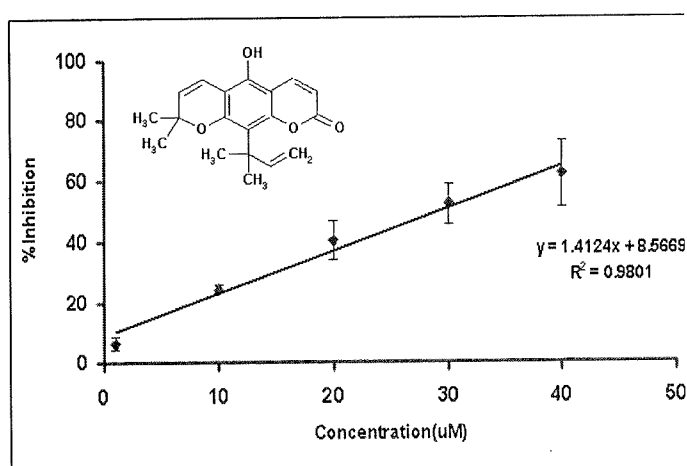
สารสกัดบริสุทธิ์จากเปลือกกรากของต้นสองฟ้าแดง 5 สาร คือ nordentatin, dentatin, osthol, xanthoxyletin และ heptaphylline รวมทั้ง Vitamin E (positive control) ได้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay การทดสอบโดยวิธีนี้ได้ใช้อนุมูลอิสระ DPPH เป็น substrate เนื่องจาก DPPH มีอิเล็กตรอนเดี่ยว มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวสูง และสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 512 nm ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดได้ถูกประเมินโดยวัดความสามารถในการ reduce อนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งผลการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระจะแสดงเป็น %inhibition ซึ่งถูกแสดงไว้ในตารางที่ 1 และรูปภาพที่ 3

ตารางที่ 1 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดบริสุทธิ์จากเปลือกกรากของต้นสอ่งฟ้าแดง 5 สาร

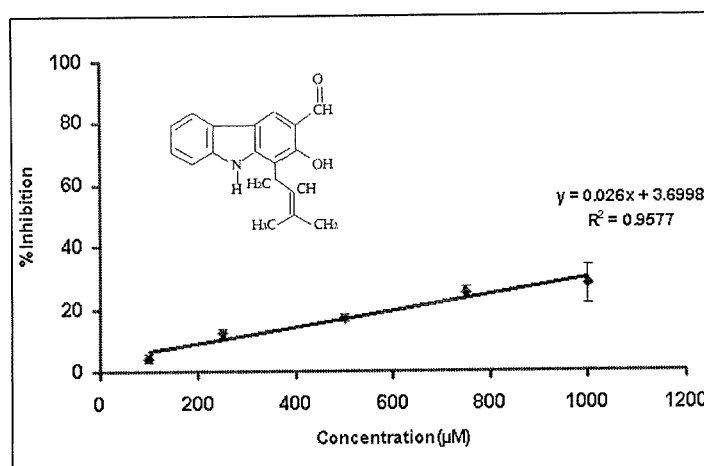
สารทดสอบ	ความเข้มข้น (μM)	% inhibition (n = 5)		สารทดสอบ	ความเข้มข้น (μM)	% inhibition (n = 5)
Vitamin E	5	8.23		heptaphylline	100	4.06
	10	22.63			250	11.98
	15	34.78			500	17.10
	20	41.03			750	25.22
	25	55.34			1000	27.83
	30	74.82				
nordentatin	1	6.51		dentatin	1000	No inhibit
	10	24.40				
	20	40.35				
	30	52.28				
	40	61.95				
xanthoxyletin	1000	No inhibit		osthol	1000	No inhibit



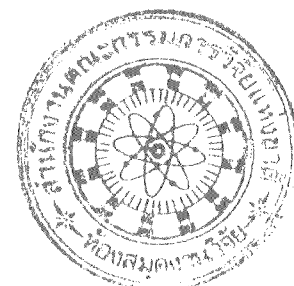
(1)



(2)



(3)



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า%Inhibition ต่ออนุมูลอิสระและความเข้มข้นของสารทดสอบ; (1) vitamin E (positive control), (2) nordentatin และ (3) heptaphylline

จากการทดลองพบว่า สาร nordentatin และ heptaphylline มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดย nordentatin มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้แรงสุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ $29.3 \mu M$ ซึ่งใกล้เคียงกับ vitamin E ($IC_{50} = 21.7 \mu M$) ซึ่งใช้เป็น positive control ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ ในขณะที่ heptaphylline มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้น้อยกว่า โดยพบว่าที่ความเข้มข้น $1000 \mu M$ สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้เพียง 27 % ส่วนสาร dentatin และ xanthoxyletin ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH แม้ว่าจะให้ความเข้มข้นสูงถึง $1000 \mu M$

3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation โดยวิธี Thiobarbituric assay (TBAR assay)

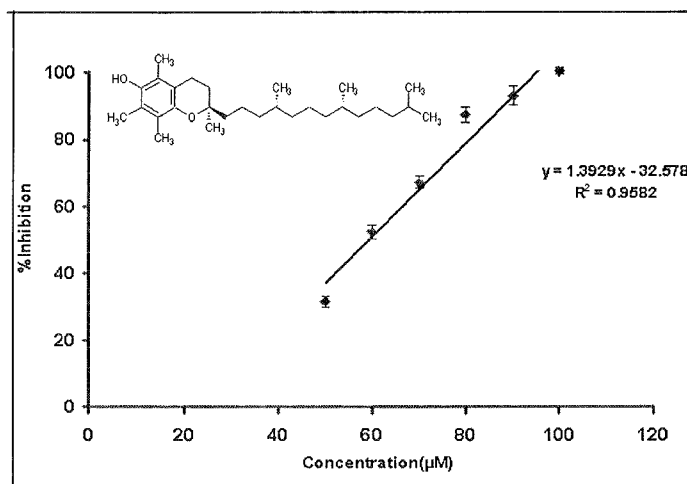
ความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งกระบวนการเกิด lipid peroxidation ของเซลล์สมองหมูถูกทดสอบโดยวิธี thiobarbituric acid assay โดยการกระตุ้นสมองหมูบั่นซึ่งถือเป็นแหล่งของไขมันให้เกิด

แผนงานที่ 2 ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและฤทธิ์ฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองของสารประกอบทางเคมีจากรากส่อกฟ้าแดง

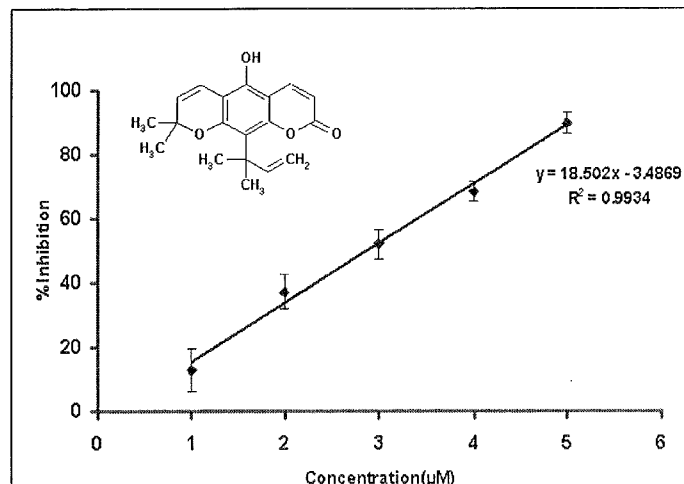
autooxidation เพื่อให้เกิด lipid radical ($ROO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$) แล้วเปลี่ยนไปเป็น malondialdehyde ในที่สุด
 ขบวนการเกิด lipid peroxidation จะถูกประเมินโดยการวัดปริมาณของ malondialdehyde ที่เกิดขึ้น ซึ่ง
 วิเคราะห์โดยการวัดปริมาณ product สีชมพูม่วงที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง malondialdehyde
 และ thiobarbituric acid ที่สามารถเรืองแสงได้เมื่อได้รับการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 528.5 nm และเกิด
 การเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 551 nm ซึ่งผลการยับยั้งขบวนการเกิด lipid peroxidation จะแสดงเป็น
 %inhibition ซึ่งถูกแสดงไว้ในตารางที่ 2 และรูปภาพที่ 4

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งขบวนการ lipid peroxidation ของสารสกัด 5 สาร

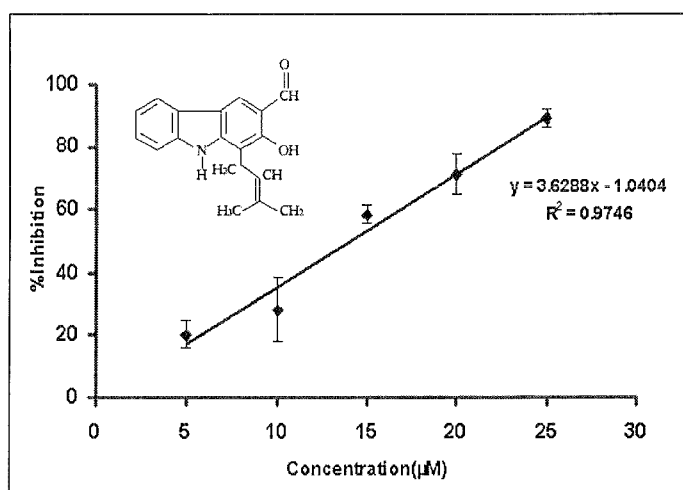
สารทดสอบ	ความเข้มข้น (μ M)	% inhibition (n = 3)		สารทดสอบ	ความเข้มข้น (μ M)	% inhibition (n = 3)
Vitamin E	50	31.41		heptaphylline	5	20.09
	60	52.21			10	28.04
	70	67.08			15	58.36
	80	87.24			20	71.27
	90	93.00			25	89.19
	100	100.41				
nordentatin	1	12.89		dentatin	50	26.05
	2	37.10			60	33.78
	3	51.98			70	40.48
	4	68.36			80	49.23
	5	89.77			90	64.13
					100	68.40
xanthoxyletin	1000	No inhibit		osthol	1000	No inhibit



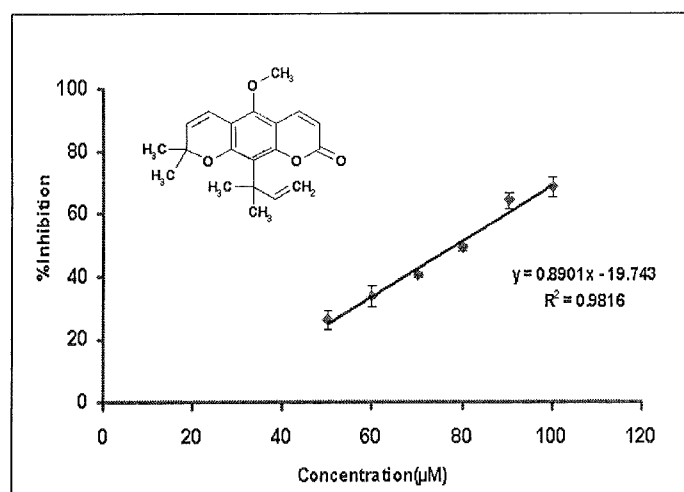
(1)



(2)



(3)



(4)

รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า %Inhibition ต่อกระบวนการ lipid peroxidation และความเข้มข้นของสารทดสอบ(μM); (1) vitamin E(positive control), (2) nordentatin, (3) heptaphylline และ (4) dentatin

จากสารสกัดทั้งหมด 5 สารที่นำมาทดสอบ พบว่า nordentatin, heptaphylline และ dentatin สามารถยับยั้งกระบวนการเกิด lipid peroxidation ได้ โดยพบว่า Nordentatin มีฤทธิ์แรงที่สุดในการยับยั้ง ขบวนการ lipid peroxidation โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.89 μM ในขณะที่ Heptaphylline และ Dentatin รวมทั้ง vitamin E มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 14.06, 78.4 and 59.29 μM ตามลำดับ ส่วน osthol และ xanthoxyletin ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง lipid peroxidation

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบผลการทดลองของทั้งสองวิธี พบว่าสาร nordentatin มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระรวมทั้งสามารถยับยั้งการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ได้ดีที่สุดในสารทดสอบทั้ง 5 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับ vitamin E ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารทั้งสองค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่ nordentatin มีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ดีกว่า vitamin E ทั้งนี้

แผนงานที่ 2 ฤทธิ์ด้านออกซิเดชั่นและฤทธิ์ฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองของสารประกอบทางเคมีจากรากสอ่งฟ้าแดง

อาจเนื่องจาก nordentatin นอกจากไปยับยั้งอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation แล้วยังไปมีผลยับยั้งกลไกอื่นที่เกี่ยวข้องในการเกิดกระบวนการได้อีกด้วย ในกรณีของสาร heptaphylline และ dentatin ซึ่งพบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยมากหรือไม่พบเลย สามารถยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ได้ โดยผ่านกลไกอื่นที่เกี่ยวข้องในการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation

ตารางที่ 3 : ค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ(DPPH) และกระบวนการ lipid peroxidation(TBA) ของสารทดสอบแต่ละสาร

Compounds	DPPH (IC_{50} , μM)	TBA (IC_{50} , μM)
Vitamin E	21.7	59.3
Nordentatin	29.3	2.9
Dentatin	inactive	78.4
Heptaphylline	27%(1000 μM)	14.1
Osthol	inactive	inactive
Xanthoxyletin	inactive	inactive

4 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกรากสอ่งฟ้าแดงต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาได้รับ scopolamine ในหนูทดลองโดยวิธี water maze

จากผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น โดยวิธีทางหลอดทดลอง (*In Vitro*) พบว่า nordentatin มีฤทธิ์สูงสุดในการกำจัด free radical และ ยับยั้ง lipid peroxidation จึงได้เลือกมาทำการศึกษาฤทธิ์ในการรักษา Alzheimer ต่อใน model สัตว์ทดลอง โดยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาได้รับ scopolamine ในหนูทดลอง โดยใช้โมเดลศึกษา คือ Morris Water Maze หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะการเรียนรู้และความจำบกพร่องโดย scopolamine และได้รับสารทดสอบได้ถูกนำมาทดสอบการเรียนรู้จดจำตำแหน่งโดยให้หนูว่ายน้ำในอ่างน้ำ (water maze) แล้วให้หนูฝึกหาแผ่นรอง (platform) ที่เอาไว้ยืนพักเหนื่อย ประเมินความสามารถในการฟื้นฟู

แผนงานที่ 2 ฤทธิ์ด้านออกซิเดชั่นและฤทธิ์ฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองของสารประกอบทางเคมีจากรากสอ่งฟ้าแดง

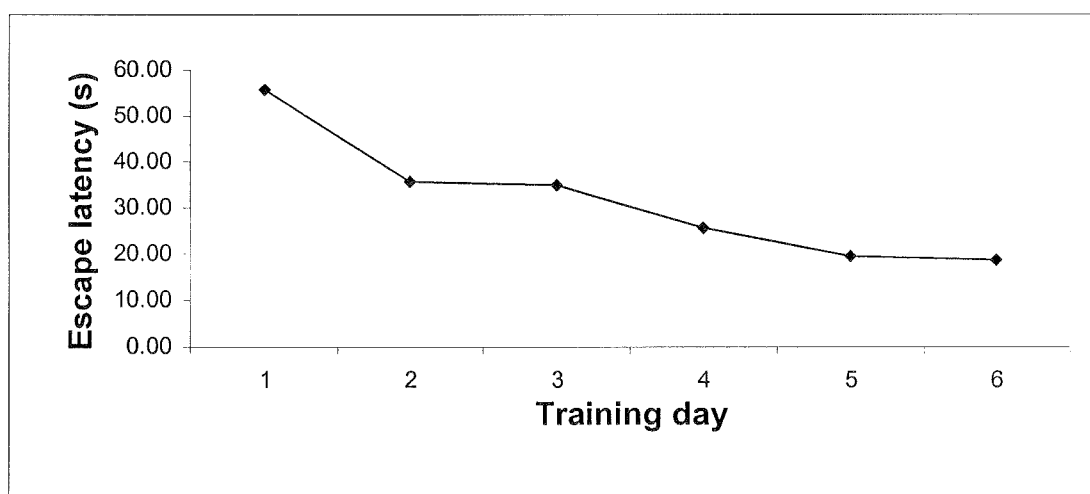
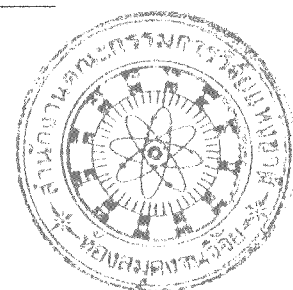
ประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำโดยการเปรียบเทียบระยะเวลาในการหาดำแหน่งของแผ่นรองก่อนและหลังการได้รับสารสกัด

วิธีการทดลองนั้นใช้หนู ICR mice เพศผู้มาฝึกให้เรียนรู้ที่จะว่ายน้ำไปยังแท่นขึ้นที่อยู่ใต้น้ำได้โดยหนูถูกฝึก วันละ 4 รอบ จนกระทั่งเวลาที่ใช้ในการหาแท่นขึ้นคงที่ คือวันที่ 5 ดังตาราง 4 และรูป 5

ตารางที่ 4. เวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการหาแผ่นรองในช่วงการฝึกหนูให้ว่ายน้ำเพื่อเรียนรู้ตำแหน่งของแผ่นรอง

Training day	Escape latency (Sec.)
	Mean $\pm$ SD (n=29)
1	55.83 $\pm$ 7.10
2	35.63 $\pm$ 13.51
3	34.87 $\pm$ 6.12
4	25.87 $\pm$ 6.61
5	19.53 $\pm$ 4.22 *
6	18.87 $\pm$ 2.08

* วันที่หนูใช้เวลาในการหาแผ่นรองคงที่



รูปที่ 5. กราฟแสดงเวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการหาแผ่นรองในช่วงการฝึกหนูให้ว่ายน้ำเพื่อเรียนรู้ตำแหน่งของแผ่นรอง

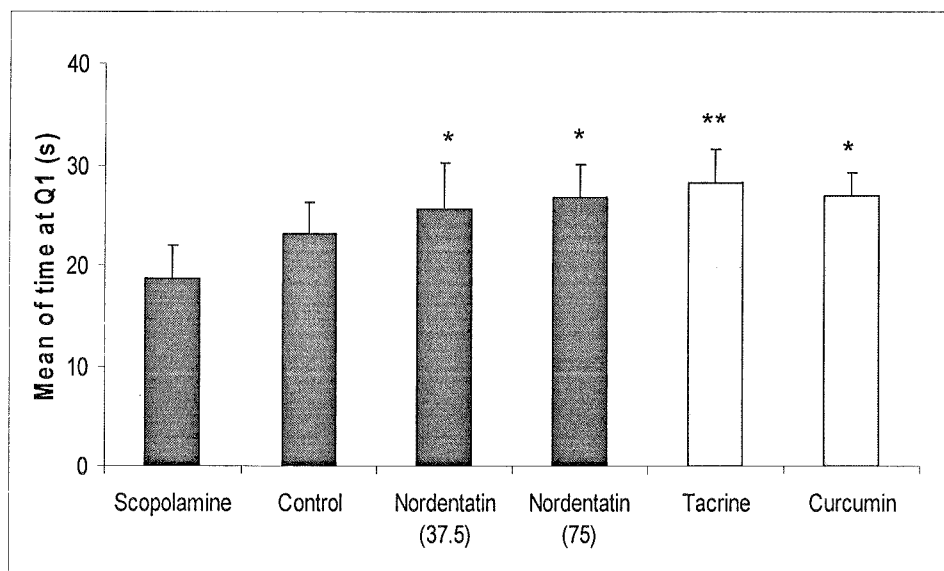
หลังจากนั้นหนูที่ถูกฝึกจะได้รับสารทดสอบ nortendatin ก่อนที่จะฉีดตามด้วย Scopolamine เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำเสื่อมในสัตว์ทดลองโดยทำการฉีดเข้าทางช่องท้องของหนู ในการทดลองนี้ได้มีการใช้ tacrine และ curcumin เป็นสารมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับ

แผนงานที่ 2 ฤทธิ์ด้านออกซิเดชั่นและฤทธิ์ฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองของสารประกอบทางเคมีจากรากสอ่งฟ้าแดง

nordentatin (37.5 และ 75 $\mu\text{mol/kg}$) นั้นจะว่ายวนในจุดภาคที่เคียวางแทนยืนไว้นานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่เกิดภาวะความจำเสื่อม ($p < 0.05$) ดังตาราง 5 และรูป 6

ตารางที่ 5. เวลาเฉลี่ยที่หนูใช้ว่ายวนในจุดภาคที่เคียวางแผ่นรองหลังจากได้รับยา

Compound	Swimming time at quadrant 1* (Sec.) After scopolamine treatment (day 9) Mean $\pm$ SD (n=4-8)	T-Test
		Compared with Induction group
Saline (Control)	23.07 $\pm$ 3.24	0.032
15% tween 80 (Induction)	18.67 $\pm$ 3.71	N/A
Tacrine (1 mg/kg)	28.20 $\pm$ 4.55	0.002
Curcumin (65 $\mu\text{mol/kg}$)	27.00 $\pm$ 3.21	0.001
Nordentatin (37.5 $\mu\text{mol/kg}$)	25.62 $\pm$ 2.29	0.005
Nordentatin (75 $\mu\text{mol/kg}$)	26.85 $\pm$ 3.69	0.001



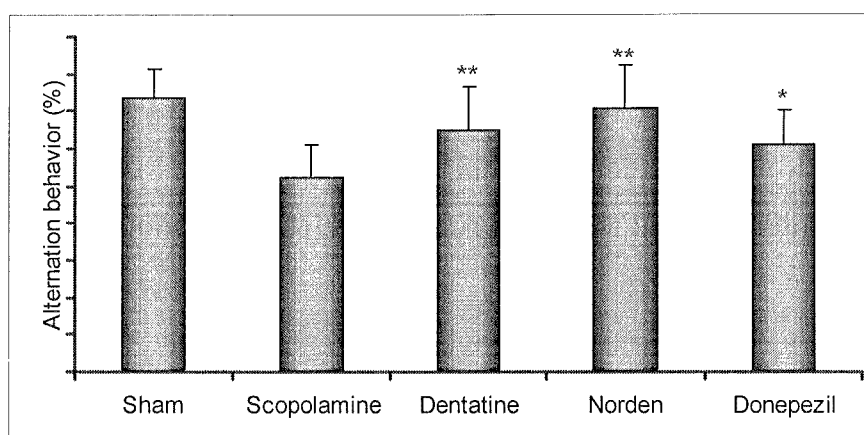
รูปที่ 6. กราฟแสดงเวลาเฉลี่ยที่หนูใช้ว่ายวนในจุดภาคที่เคียวางแผ่นรองหลังจากได้รับยา

แผนงานที่ 2 ฤทธิ์ด้านออกซิเดชั่นและฤทธิ์ฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองของสารประกอบทางเคมีจากรากสอ่งฟ้าแดง

5 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกรากส่่งฟ้าแดงต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ scopolamine ในหนูทดลองโดยวิธี Y Maze

ผลของสารสกัดต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ scopolamine ในหนูทดลองทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา คือ Y-maze หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะการเรียนรู้และความจำบกพร่องโดย scopolamine และได้รับสารสกัด จะถูกนำมาทดสอบภาวะความจำบกพร่องด้วย Y-maze apparatus โดยหนูจะถูกปล่อยจากปลายแขนข้างหนึ่งของ Y-maze แล้วปล่อยให้หนูอยู่ในอุปกรณ์เป็นเวลา 8 นาที ทำการบันทึก alternation behavior (%) ของหนูทดลองเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า ทั้ง nordentatin และ dentatin ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{mol/kg}$ มีความสามารถในการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ scopolamine ดังรูป 7 โดยพบว่า nordentatin มีฤทธิ์สูงสุดด้วยค่า alternation score เท่ากับ 70.4 %



รูปที่ 7 ผลของสารสกัดต่อ alternation behavior ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย scopolamine ในโมเดล Y Maze test. The data shown as mean + SD

(n = 12-15). * and ** = p-value < 0.05 and <0.01, respectively, comparing to scopolamine group

6 การศึกษาผลของ nordentatine ต่อภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการฉีด Amyloid- β_{25-35} protein เข้าทาง intracerebroventricle ในหนู โดยวิธี Y-maze

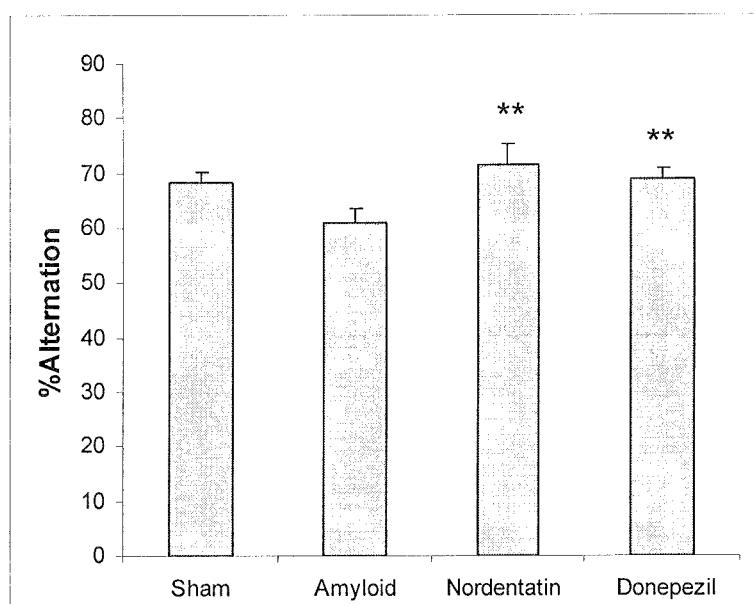
ผลของสารสกัดต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ Amyloid- β_{25-35} ในหนูทดลองทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา คือ Y-maze หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะการเรียนรู้และความจำบกพร่องโดยการฉีด Amyloid- β_{25-35} เข้าทาง Intracerebroventricular (i.c.v.) และได้รับสารสกัดจะถูกนำมาทดสอบภาวะความจำบกพร่องด้วย Y-maze apparatus โดยหนูจะถูกปล่อยจากปลายแขนข้างหนึ่งของ Y-maze แล้วปล่อยให้หนูอยู่ในอุปกรณ์เป็นเวลา 8 นาที ทำการบันทึก

alternation behavior (%) ของหนูทดลองเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง ดังตาราง 6 และรูป 8

ตารางที่ 6 alternation behavior (%) ของหนูทดลอง ใน model Y maze

Group (n = 8-12)	% alternation $\pm$ SEM
Sham	68.2 $\pm$ 2.17
Amyloid- β_{25-35}	60.9 $\pm$ 2.52
Amyloid- β_{25-35} + norentatin (50 μ mol/kg),	71.4 $\pm$ 3.77**
Amyloid- β_{25-35} + donepezil (0.5 mg/kg),	68.8 $\pm$ 2.15**

** p-value < 0.05 vs A□ treatment group



รูปที่ 8 ผลของสารสกัด norentatin ต่อ alternation behavior ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Amyloid- β ในโมเดล Y Maze test. The data shown as mean + SD (n = 12-15). * and ** = p-value < 0.05 and <0.01, respectively, comparing to scopolamine group

จากผลการทดลองพบว่า norentatin ที่ความเข้มข้น 50 μ mol/kg มีความสามารถในการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องจากได้รับ beta-amyloid ด้วยค่า alternation score เท่ากับ 71.4 %

แผนงานที่ 2 ฤทธิ์ด้านออกซิเดชั่นและฤทธิ์ฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองของสารประกอบทางเคมีจากรากสอ่งฟ้าแดง