

2. การทบทวนวรรณกรรมวิจัย

มะม่วงจัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสูง นอกจากนั้นประเทศไทยยังเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่ของผลไม้ชนิดนี้ มีรายงานว่าไทยมีรายได้จากการส่งออกมะม่วงสูงมาก มูลค่าการส่งออกในตลาดปี 2006 สูงถึง 432,457,806 บาท ข้อมูลจากการศึกษาเกี่ยวกับคุณค่าทางโภชนาการของผลไม้เหล่านี้ของกองโภชนาการกรมอนามัย พบว่าผลไม้ชนิดนี้มีระดับสารเบต้าแคโรทีนสูง 59 มิลลิกรัม¹ นอกจากนั้นยังพบสารที่มีประโยชน์อื่นๆอีกมาก เช่น พบสารต้านอนุมูลอิสระ กลุ่ม vitamin A, vitamin C และ vitamin E ถึง 25%, 76% และ 9% Dietary Reference Intake (DRI) ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่ายังมี vitamin B6 ซึ่งมีอิทธิพลต่อการทำงานของระบบประสาทอีกถึง 11%DRI² เปลือกมะม่วงซึ่งเราไม่ได้ใช้และทิ้งไปนั้นก็มีส่วนต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก³ มีสาร carotenoid และ polyphenol ที่สำคัญได้แก่ quercetin, kaempferol, gallic acid, caffeic acid, catechins, tannins นอกจากนั้นยังพบว่ามีสาร xanthone และ mangiferin ซึ่งสามารถต้านฤทธิ์อนุมูลอิสระในภาวะที่มีพยาธิสภาพที่เกิดจากการเพิ่มอนุมูลอิสระได้⁴⁻⁵

เมื่อเร็วๆนี้มีรายงานว่า oxidative stress นั้นมีบทบาทสำคัญใน ในกลุ่มโรคหรือความผิดปกติทางจิตและประสาทหลายชนิดรวมทั้ง ภาวะซึมเศร้า (depression)⁶⁻⁹ ความจำบกพร่อง (mild cognitive impairment) และโรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease)¹⁰ มีรายงานว่าในผู้ป่วย major depressive นั้นจะมีระดับ total oxidative stress และ oxidative stress index เพิ่มขึ้นแต่มี total antioxidant activity ลดลง และหลังได้รับการรักษาในผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาดีจะมีระดับ total oxidative stress และ oxidative stress index ลดลงในขณะที่มี total antioxidant activity เพิ่มขึ้น¹¹ นอกจากนั้นยังพบว่าหนูที่มีการ expression ของ glutathione reductase gene ในสมองสูงจะมีอาการคล้ายกังวล และเมื่อยับยั้งการทำงานของสารดังกล่าวจะมีผลลดอาการดังกล่าว¹²

ในโรคสมองเสื่อมเองนั้นก็พบว่าจะมีการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทโคลิเนอร์จิกซึ่งเป็นเซลล์ประสาทที่มีบทบาทสำคัญในเรื่องการเรียนรู้และความจำเพิ่มขึ้น¹³⁻¹⁶ นอกจากนั้นยังพบว่ามีรายงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าในกลไกหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดพยาธิสรีรวิทยาในโรคสมองเสื่อมได้แก่ oxidative stress¹⁷⁻¹⁸ และสารต้านอนุมูลอิสระสามารถทำให้ความจำบกพร่องดีขึ้น¹⁹⁻²⁰

เมื่อเร็วๆนี้มีรายงานว่าสารเบต้าแคโรทีนมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทในส่วน cerebral cortex²¹⁻²² นอกจากนั้นยังพบว่าสารเบต้าแคโรทีนยังช่วยลดความจำบกพร่องในหนูที่ตัดต่อพันธุกรรมให้แก่ ชนิด SAMP8²¹ นอกจากนั้นเมื่อเร็วๆนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดมะม่วงยังมีผลลดการทำลายสมองจาก glutamate²⁴ สารสกัดเนื้อมะม่วงสุกเองก็มีรายงานว่าสามารถลด cell cytotoxicity ที่เหนี่ยวนำโดย oxidative stress ได้²⁵

3. วิธีวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุก

3.1.1 การเตรียมสารสกัดน้ำจากผลมะม่วงน้ำดอกไม้สุก

นำมะม่วงสุกมาเตรียมเป็น homogenate ด้วยวิธีของ Prasad และคณะ (2008)²⁶ โดยการใช้เนื้อมะม่วง 20 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยผ้ามัดตินแล้วนำส่วนที่กรองได้ไป centrifuge ประมาณ 4000 g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็น supernatant มาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.1.2 การเตรียมสารสกัดแอลกอฮอล์จากมะม่วงน้ำดอกไม้สุก

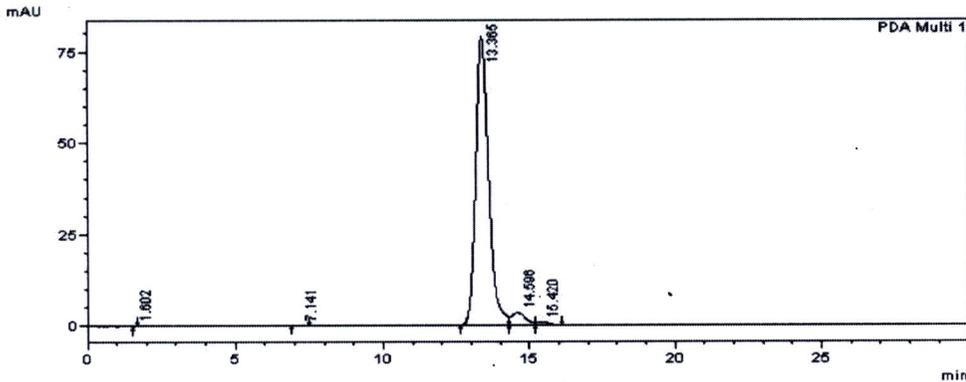
นำตัวอย่างมะม่วงล้างด้วยน้ำจนสะอาดเปลือกจากนั้นหั่นเอาเฉพาะส่วนเนื้อมะม่วง แล้วนำเนื้อมะม่วงที่ได้ปั่นให้ละเอียด แล้วเทลงในภาชนะแล้วห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ นำภาชนะเข้าสู่ freeze dryer นาน 3 วัน (หรือจนกว่าเนื้อมะม่วงจะแห้ง) ชั่งน้ำหนักและบันทึกผล จากนั้นจะเตรียมสารสกัดแอลกอฮอล์โดย ชั่งน้ำหนักเนื้อมะม่วงแห้ง บันทึกน้ำหนัก นำไปใส่ในโหลแก้ว เติมน้ำ Ethanol (commercial grade) ลงไปพอท่วมเนื้อมะม่วง แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่พ่นแสง หมักไว้ 3 ชั่วโมงจึงนำไปกรองแล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C จนได้สารสกัดที่มีลักษณะเหนียว กากมะม่วงนำไปหมักอีก 2 ครั้ง ด้วยวิธีเดิมแล้วบันทึกผล ได้ % yield ของสารสกัดต่อเนื้อมะม่วงแห้ง 6.91 ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลการสกัดมะม่วงด้วย Ethanol

พืชตัวอย่าง	น้ำหนักพืชแห้ง (g.)	น้ำหนักสารสกัด (g)	% yield	ethanol ที่ใช้ (L)
มะม่วงน้ำดอกไม้สุก	169	55	6.91	2

3.2 การตรวจวัดระดับเบต้าแคโรทีน

องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญและมีฤทธิ์ทางชีวภาพในมะม่วงสุกคือ β -carotene ผู้วิจัยจึงทำการพัฒนาการวิเคราะห์ β -carotene ในสารสกัดมะม่วงโดยผ่าน reversed phase HPLC column และใช้ mobile phase คือ methanol: acetonitrile: dichloromethane 85.5:9.5:5 ที่มี 9 μ M TEA พบ peak ของ β -carotene ที่ 13.3 นาที (ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2) วิธีวิเคราะห์นี้ สามารถพัฒนาต่อไปเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณของ β -carotene ในมะม่วงได้ ผลการตรวจวัดปริมาณของเบต้าแคโรทีนในสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกประมาณ 47.21 μ g/g และมีปริมาณของเบต้าแคโรทีนในสารสกัดน้ำของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกประมาณ 6.19 μ g/g



รูปที่ 1 Chromatogram ของ β -carotene reference standardจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.3 การตรวจวัด total phenolic compound

จะทำการตรวจวัดปริมาณ total phenolic compound ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu²⁷ โดยนำสารสกัด 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Folin-Ciocalteu reagent 5 มิลลิลิตร และ deionised water 70 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 1 นาทีใส่ sodium carbonate solution (15 ml ของ 20% (m/v) sodium carbonate anhydrous form ผสมกับ deionised water) จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วย deionised water หลังจากตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมงจะนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 760 nm โดยใช้ gallic acid เป็น standard

3.4 สัตว์ทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้หนูขาวเพศผู้ชนิด Wistar จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลาฯ นครปฐม เป็นสัตว์ทดลอง หนูวัยเจริญพันธุ์จะใช้หนูอายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 180-200 กรัม และหนูแก่จะเป็นหนูที่นำมาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลาฯ นครปฐม แล้วนำมาเลี้ยงจนอายุ 16 สัปดาห์เป็นสัตว์ทดลอง เลี้ยงไว้ในกรง กรงละ 5 ตัว สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงไว้ภายใต้ light-dark cycle 10:14 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ สัตว์ทดลองได้รับอาหารและน้ำอย่างสมบูรณ์

หลังจากสัตว์ทดลองถูกแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ จะได้รับการป้อนสารสกัดหรือ vehicle หรือสารที่ใช้เป็น positive control วันละครั้งทาง feeding needle อย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง โดยจะมีการประเมินดัชนีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับการเรียนรู้และความจำเป็นระยะๆ คือหลังได้รับสารที่ assign เพียงครั้งเดียวและทุก 7 วันจนสิ้นสุดการทดลอง

3.5 การเหนี่ยวนำให้เกิด Alzheimer's disease โดยการใช้ cholinotoxin AF64A

สาร AF 64A จะถูกเตรียมด้วยวิธีของ Fisher และคณะ (1982) โดยจะละลาย acetylcholine mustard hydrochloride (Sigma, St.Louis, MO) ในน้ำและปรับ pH ให้เป็น 11.3 ด้วย NaOH นำไปคนต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นค่อยๆปรับ pH ลงด้วย HCl ให้ pH เป็น 7.4 นำไปคนต่ออีก 60 นาที จากนั้นปรับความเข้มข้นให้เป็น 2 nmol/ μ l สำหรับ vehicle ที่ใช้ในการนำส่ง AF64A นี้เป็น artificial CSF (ACSF) ซึ่งเตรียมขึ้นโดยใช้น้ำกลั่นและเตรียมผ่านกระบวนการทั้งหมดเช่นเดียวกับ AF 64A

หลังจากสัตว์ทดลองถูกวางยาสลบด้วย sodium pentobarbital ขนาด 60 mg/kg BW ทาง intraperitoneal route สัตว์ทดลองจะถูกนำมาเหนี่ยวนำให้เกิด Alzheimer's disease โดยการฉีด AF64A ลงไปใน lateral ventricle ทั้งสองข้าง โดยใช้ stereotaxic coordinate ดังนี้ (นับจาก bregma) posterior 0.8 mm, lateral \pm 1.5 mm และ ventral จากตำแหน่ง dura 3.6 mm ด้วยอัตรา 1.0 μ l/min จากนั้นล้างเข็มไว้ที่ตำแหน่งเดิมต่ออีก 5 นาที ก่อนจะถอนเข็มออก

3.6 การประเมินการเรียนรู้และความจำ

3.6.1.1 การประเมินการเรียนรู้และความจำชนิดที่เกี่ยวข้องกับทิศทาง (spatial memory)

สัตว์ทดลองจะถูกนำมาประเมินการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze test ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการประเมินความจำชนิด spatial memory ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางการทดสอบการเรียนรู้และความจำ โดยจะให้หนูเรียนรู้ที่จะจดจำตำแหน่งของแท่นที่ซ่อนอยู่ใต้น้ำในอ่างน้ำที่แบ่งเป็น 4 quadrant และโรยผงแป้งไว้ที่ผิวน้ำเพื่อไม่ให้ หนูมองเห็นว่าแท่นซ่อนอยู่บริเวณใด เพื่อให้สามารถจำตำแหน่งของแท่นที่ซ่อนไว้ หนูทดลองจะต้องเรียนรู้ที่จะสร้างความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งใน quadrant ที่หนูอยู่และตำแหน่งใน quadrant ที่ซ่อนแท่นไว้ใต้น้ำ เวลาที่หนูใช้ในการว่ายน้ำไปหาแท่นจะเรียกว่า escape latency 24 ชั่วโมงต่อมาสัตว์ทดลองจะถูกนำมาทดสอบอีกครั้ง โดย ครั้งนี้จะนำเอาแท่นที่เคยซ่อนอยู่ใต้น้ำออก หนูที่จำได้ว่าแท่นซ่อนอยู่ตำแหน่งใดจะว่ายน้ำวนอยู่ใน quadrant ที่เคยซ่อนแท่นไว้ในเวลาที่กำหนดมากกว่าหนูที่จำไม่ค่อยได้ เวลาที่หนูว่ายน้ำวนใน quadrant ที่เคยซ่อนแท่นไว้ใต้น้ำเรียกว่า retention time ดังนั้นหนูที่มีความจำดีจะมี escape latency สั้นหรือ retention time ยาว

3.6.1.2 การประเมินการเรียนรู้และความจำชนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกับทิศทาง (nonspatial memory)

ในการศึกษาฤทธิ์สารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อความจำชนิด non-spatial memory นั้นคณะผู้วิจัยทำการศึกษาโดยเลือกใช้ object recognition test เพื่อวัดความสามารถในการแยกแยะความแตกต่างระหว่างวัตถุเดิม (หรือวัตถุที่คุ้นเคย) และวัตถุใหม่ (หรือวัตถุที่ไม่คุ้นเคย) การทดสอบชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมการสำรวจ ความสนใจ การเรียนรู้และความจำในหนูทดลอง โดยจะวัดพฤติกรรมดังกล่าวที่เวลา 30 นาที และ 6 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับสารสกัด

3.7 การประเมินฤทธิ์คลายกังวล

จะประเมินฤทธิ์คลายกังวลโดยการทดสอบความกลัวและอาการวิตกกังวลของหนู เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่อันตรายด้วย elevated plus maze test โดยถ้าสารมีฤทธิ์คลายกังวลหนูจะเข้าไปใน open arm หรือใช้เวลาใน open arm นานขึ้นภายในเวลา 5 นาที

3.8 การประเมินฤทธิ์ต้านการซึมเศร้า

ทดสอบฤทธิ์ต้านซึมเศร้าทำในสัตว์ทดลองโดยการบังคับหนูให้ว่ายน้ำ (forced swimming test) จะบังคับให้หนูขาวว่ายน้ำวันละ 5 นาที จับเวลาที่หนูขาวลอยตัวนิ่งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หนูที่มีอาการซึมเศร้าลดลงจะมีเวลาเวลาที่หนูขาวลอยตัวนิ่งลดลง

3.9 การประเมินความหนาแน่นของเซลล์ประสาท

สัตว์ทดลองจะถูกนำมาเตรียมชิ้นเนื้อของสมองโดยทำ transcardial perfusion ด้วยสารละลาย 4% paraformaldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 หลังจากนั้นนำไปแช่ใน 30% scrose ให้อิมมัตว์ แล้วนำมาตัด section ให้มีความหนา 30 μ M นำไปย้อมด้วย cresyl violet staining และ immunohistochemical technique เพื่อดูความหนาแน่นของเซลล์ประสาท และเซลล์ประสาทโคลิเนอร์จิกสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

3.10 การตรวจวัด acetylcholinesterase, scavenger enzyme activity และ lipid peroxidation

สัตว์ทดลองจะถูก sacrificed โดยการทำให้ cervical dislocation จากนั้นจะแยกสมองส่วน hippocampus มาเตรียมเป็น brain homogenate และตรวจวัด activity ของ acetylcholinesterase enzyme ด้วยวิธีของ Ellman และคณะ (1961) ตรวจวัด enzyme activity ของ scavenger enzymes ได้แก่ superoxidè dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GSH-Px) ด้วยวิธี coloretic method และตรวจวัดปริมาณ lipid peroxidation product หรือ malondialdehyde (MDA) โดยวิธีของ Ohkawa et al (1979).

3.11 แผนการทดลอง

3.11.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงต่อระบบประสาทส่วนกลาง

จะแบ่งหนูขาวเพศผู้พันธุ์ Wistar เป็นกลุ่มต่างๆดังนี้คือกลุ่มที่ 1) กลุ่มควบคุมที่เป็น naïve intact control ซึ่งไม่ได้รับ treatment ใดๆ 2) กลุ่ม vehicle treatment 3) positive control ซึ่งจะได้รับยาที่ใช้เป็น standard drug ในการลดความกังวล คือ diazepam หรือยาที่ใช้ลดอาการซึมเศร้า fluoxetine ในการประเมินฤทธิ์คลายกังวลและต้านการซึมเศร้าตามลำดับ 4)-6) Mango juice extract (MJ) เป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะม่วงขนาดต่างๆคือ 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สัตว์ทดลองจะได้รับการป้อนสารทดสอบเป็นเวลา 4 สัปดาห์และประเมินฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางเป็นระยะๆคือหลังได้รับสารทดสอบเพียงครั้งเดียว หลังได้รับสารทดสอบไปเป็นระยะเวลา 1,2,3 และ 4 สัปดาห์ โดยดูฤทธิ์คลายกังวลด้วยการประเมินจำนวนครั้งที่หนูเข้าไปอยู่ใน open arm และเวลาที่หนูเข้าไปอยู่ใน open arm ของ elevated plus maze test ประเมินฤทธิ์ต้านเครียดโดยประเมินเวลาของ immobility time ใน forced swimming test และ



ประเมินฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้และความจำที่เกี่ยวข้องกับทิศทาง (spatial memory) โดยประเมินเวลาที่หนูใช้ว่ายน้ำไปหาแท่นที่ซ่อนไว้ได้น้ำหรือ escape time และเวลาที่หนูใช้ว่ายน้ำใน quadrant ของ water bath tub ซึ่งเคยซ่อนแท่นไว้ได้น้ำหลังจากที่ประเมิน escape time ไว้ 24 ชั่วโมงโดยครั้งนี้จะนำเอาแท่นได้น้ำที่เคยซ่อนไว้ออกหรือที่เรียกว่า retention time นอกจากนี้ยังประเมินความจำที่ไม่เกี่ยวข้องกับทิศทาง (non-spatial memory) โดยการวัด total exploration time ของหนูที่ใช้ในการสำรวจวัตถุใหม่

3.11.2 การทดสอบฤทธิ์ลดความบกพร่องการเรียนรู้และความจำในภาวะ Alzheimer's disease

จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกมีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้และดังนั้นจึงได้นำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบในภาวะความจำบกพร่องที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ hypocholinergic function เช่นเดียวกับที่พบในภาวะความจำบกพร่องในโรคสมองเสื่อมหรือ Alzheimer's disease ด้วยการฉีดสาร cholinotoxin หรือ AF64A เข้าไปในโพรงสมองทั้งสองข้าง ในการทดลองนี้จะแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองเป็นกลุ่มต่างๆดังนี้ 1) vehicle+ACSF เป็นกลุ่มที่ได้รับ vehicle และฉีดสาร artificial cerebrospinal fluid (ACSF) ซึ่งใช้เป็น vehicle ของ AF64A เข้าไปในโพรงสมองทั้งสองข้าง 2) vehicle+AF64A เป็นกลุ่มที่ได้รับ vehicle และฉีดสาร AF64A 3) Donepezil+AF64A และ 4) Vit C+AF64A เป็นกลุ่มที่ได้รับ donepezil และ vitamin C เข้าในโพรงสมองทั้งสองข้าง แต่สัตว์ทดลองจะได้รับการป้อนสารทดสอบต่างๆตามที่ได้แบ่งกลุ่มไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์แล้วจึงเหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่องด้วย AF64A จากนั้นจะป้อนสารสกัดต่อไปอีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงประเมินการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze test

ในการศึกษาครั้งนี้หนูกลุ่ม positive control ที่ได้รับ donepezil จะได้รับสารในขนาด 1 mg/kg BW และหนูที่ได้รับ vitamin C จะเป็นหนูที่ได้รับสารดังกล่าวในขนาด 250 mg/kg BW

3.11.3 การทดสอบฤทธิ์ปกป้องเซลล์สมองในภาวะ Alzheimer's disease

เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความรุนแรงของความจำบกพร่องสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงประเมินฤทธิ์สารสกัดน้ำของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกซึ่งมีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองได้ทั้งในภาวะความจำบกพร่องซึ่งจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อมและภาวะปกติต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทบริเวณต่างๆของ hippocampus โดยแบ่งหนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ เป็นกลุ่มต่างๆได้แก่ 1) กลุ่มที่ได้รับ vehicle และ AF64A 2) กลุ่มที่ได้รับ donepezil และ AF64A 3) กลุ่มที่ได้รับ vitamin C และ AF64A 4)-6) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดน้ำของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 12.5, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวและ AF64A ตามลำดับ โดยหนูจะได้รับการฉีด AF64A เข้าในโพรงสมองทั้งสองข้างหลังจากได้รับสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุก 2 สัปดาห์ สัตว์ทดลองทุกตัวจะได้รับการป้อน vehicle หรือ สารที่ใช้เป็น positive control หรือสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนฉีด AF64A และจะให้สารที่กล่าวข้างต้นต่อไปหลังฉีดสาร AF64A เข้าไปในโพรง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่..... 11 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน..... 245541
เลขเรียกหนังสือ.....