สมองต่ออีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำสัตว์ทดลองมาประเมินความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ซึ่งเป็นสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ

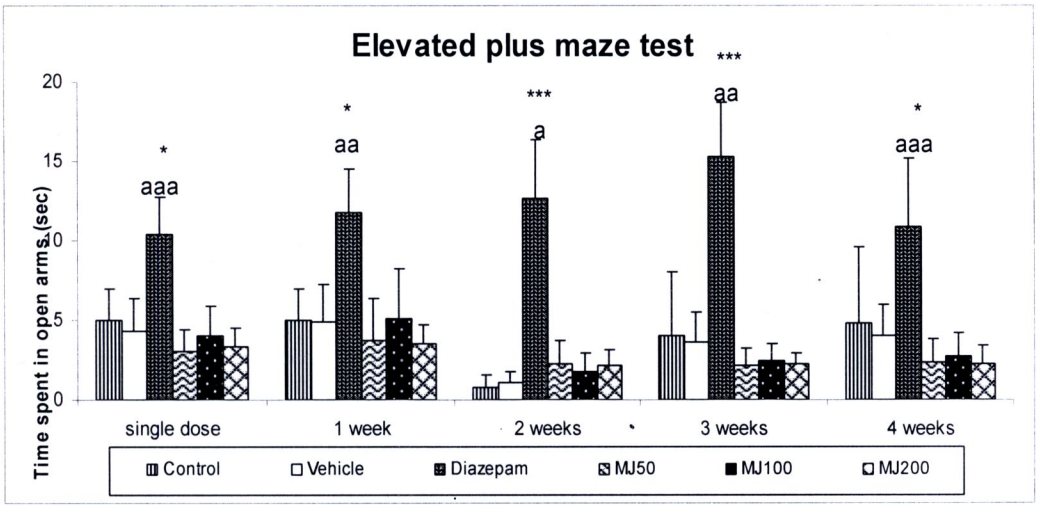
3.12 สถิติวิเคราะห์

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) ± ส่วนเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย (S.E.M) การทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจะทำโดย One-way analysis of variance (ANOVA) และ LSD post hoc test ค่า p-value< .05 จะถือว่ามีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

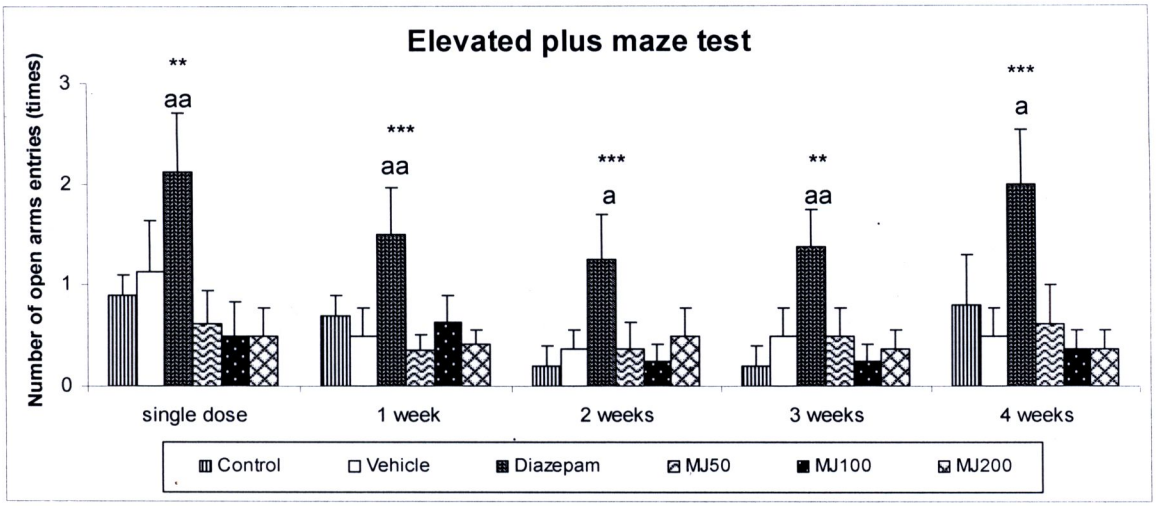
4. ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงต่อระบบประสาทส่วนกลาง

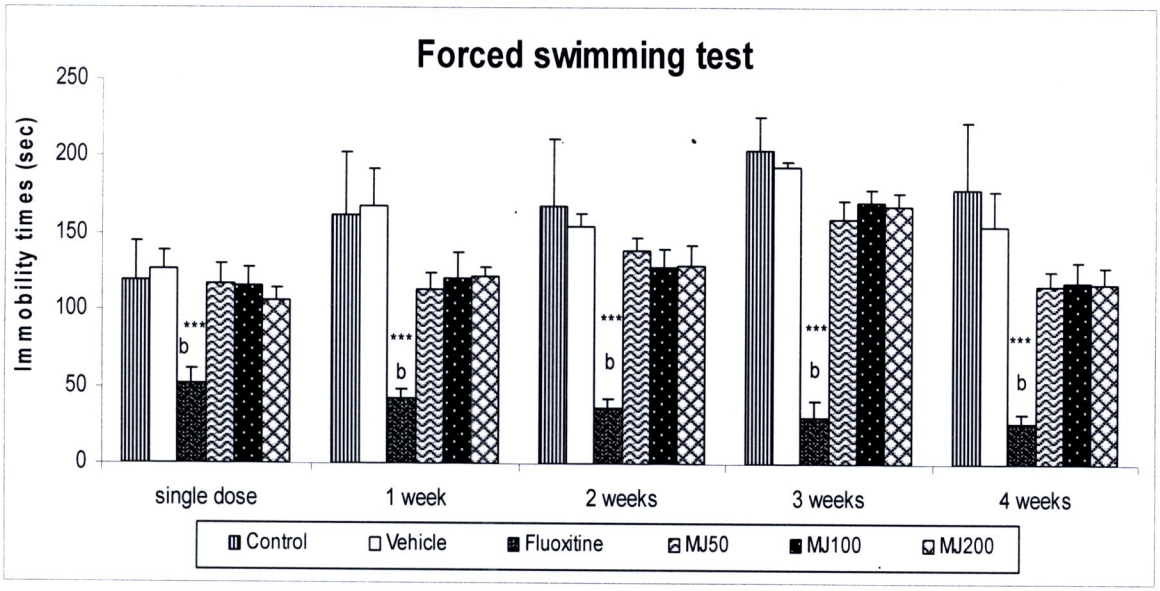
ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดมะม่วงทั้งสามขนาดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเวลาที่หนูอยู่ใน opened arm ของ elevated plus maze ตลอดจน จำนวนครั้งที่หนูเข้าไปใน opened arm ตลอดระยะเวลาการศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 นอกจากนั้นสารสกัดทั้งสามขนาดยังไม่มีผลลด immobility time ใน forced swimming test ดังแสดงในรูปที่ 4 ดังนั้นจะเห็นว่าสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกไม่มีฤทธิ์คลายกังวลหรือต้านอาการซึมเศร้า



รูปที่ 2 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อการเปลี่ยนแปลงเวลาที่หนูใช้ใน opened arm (n=8/กลุ่ม) $^{*, ***}$P<.05; .001 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle ^{a,aa,aaa} P<.05; .01; .001 เทียบกับกลุ่มควบคุม

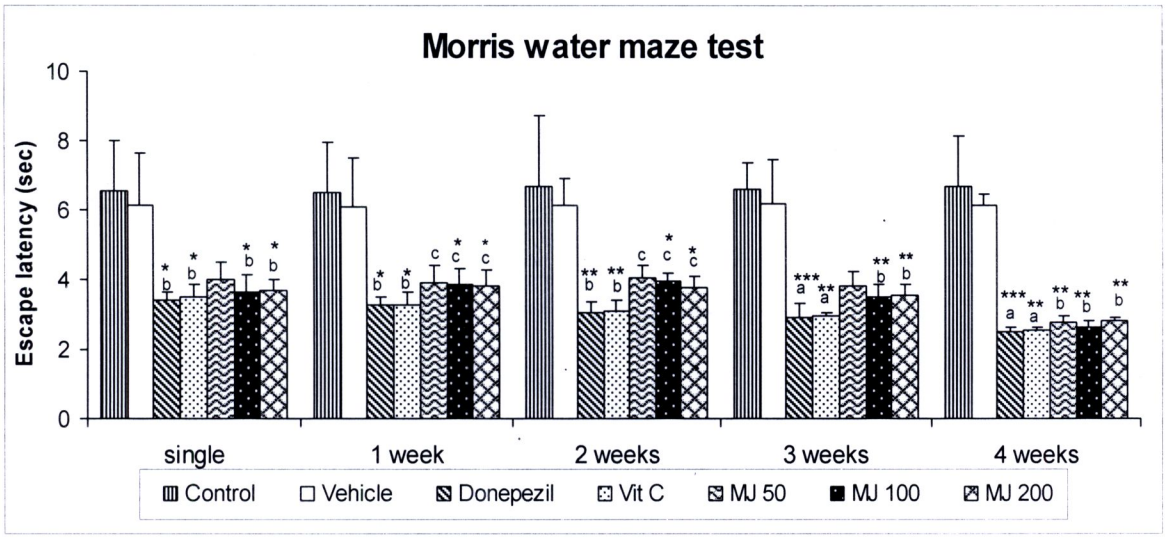


รูปที่ 3 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อจำนวนครั้งที่หนูเข้าไปใน opened arm (n=8/กลุ่ม) $^{**, ***}P<.01; .001$ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle $^{a,aa, aaa}P<.05; .01; .001$ เทียบกับกลุ่มควบคุม

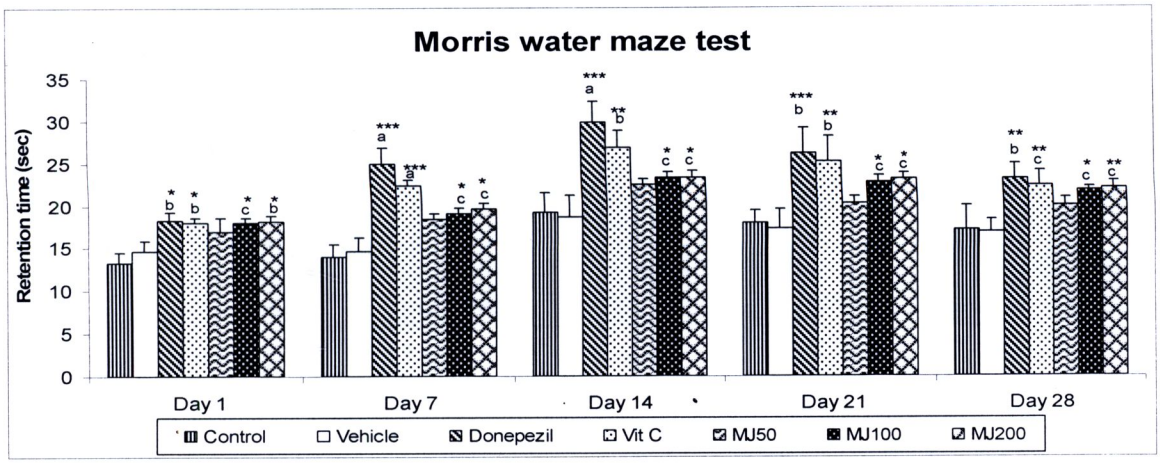


รูปที่ 4 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อการเปลี่ยนแปลง immobility time ใน forced swimming test (n=8/กลุ่ม) $^{***}P<.001$ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle $^{b}P<.01$ เทียบกับกลุ่มควบคุม

ในการทดสอบฤทธิ์สารสกัดดังกล่าวต่อการเรียนรู้และความจำที่เกี่ยวข้องกับทิศทางที่ประเมินโดย Morris water maze test ได้ทำการทดลองโดยแบ่งกลุ่มทำนองเดียวกับที่กล่าวข้างต้นแต่ในกลุ่ม positive control นั้นจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยได้แก่ กลุ่มที่ได้รับยาที่ใช้ลดความจำบกพร่องกลุ่ม acetylcholinesterase inhibitor หรือ donepezil และกลุ่มที่ได้รับ well antioxidant และมีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้และความจำ[28] ผลการศึกษาพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดมะม่วงทั้งสามขนาดมีฤทธิ์ลดเวลาที่หนูใช้ในการว่ายน้ำไปหาแท่นที่ซ่อนไว้ใต้น้ำ (escape latency time) ในการประเมินด้วย Morris water maze test อย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่หนูได้รับสารสกัดไปเพียงครั้งเดียวและจะพบฤทธิ์ดังกล่าวไปจนกระทั่งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะม่วง ไม่ต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับ donepezil ซึ่งเป็น สารที่ยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase และ หนูกลุ่มที่ได้รับ vitamin C ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดังแสดงในรูปที่ 5 หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวจะมีการเพิ่ม retention time อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่หลังได้รับสารสกัดเพียงครั้งเดียวไปจนตลอดระยะเวลาการทดลอง ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะม่วงขนาดต่ำคือ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวจะมีการเพิ่ม retention time อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่หลังได้รับสารสกัดเพียงครั้งเดียวไปจนกระทั่ง 7 วันหรือ 1 สัปดาห์หลังได้รับสารสกัด ดังแสดงในรูปที่ 6 ดังนั้นจะเห็นว่าสารสกัดมะม่วงโดยเฉพาะขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวสามารถเพิ่มการเรียนรู้และความจำที่เกี่ยวกับทิศทางในหนูปกติได้ดี

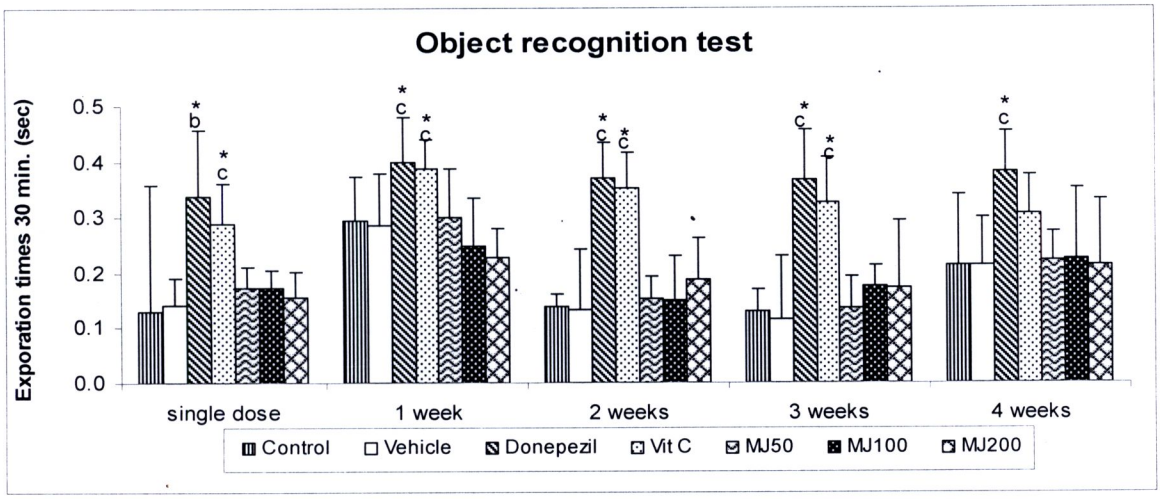


รูปที่ 5 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อเวลาที่หนูใช้ว่ายน้ำหาแท่นที่ซ่อนใต้น้ำ (escape latency time) (n=8/กลุ่ม) $^{*,**,***}P<.05; .01; .001$ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle $^{a,b,c}P<.05; .01$ และ .001 เทียบกับกลุ่มควบคุม

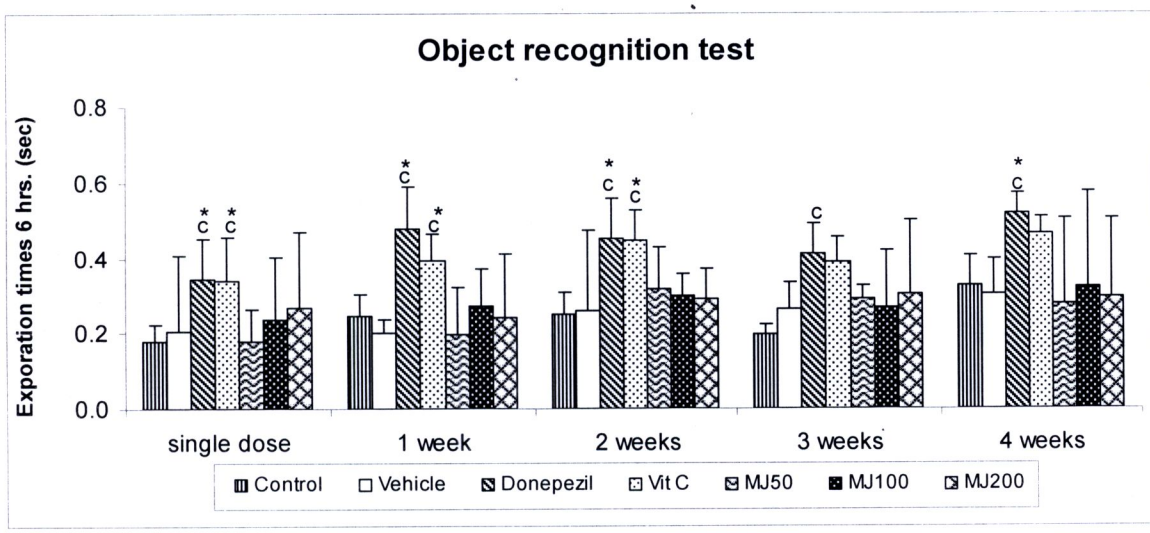


รูปที่ 6 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อ retention time (n=8/กลุ่ม) $^{*,**,***}P<.05; .01; .001$ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle $^{a, b, c}P<.05; .01$ และ .001 เทียบกับกลุ่มควบคุม

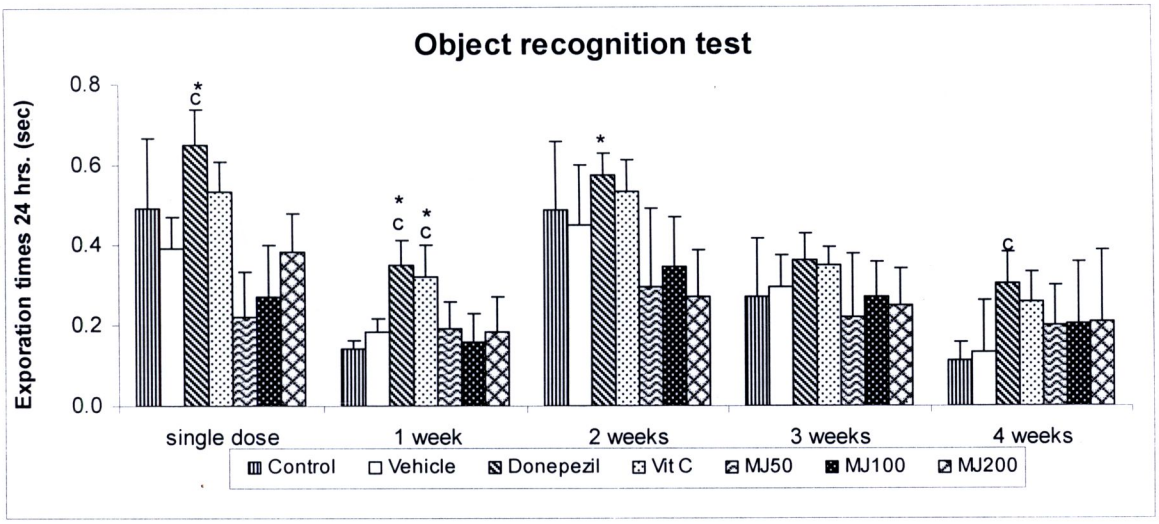
คณะผู้วิจัยได้ทำการประเมินผลสารสกัดต่อการเรียนรู้ชนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกับทิศทางด้วย object recognition test โดยจะประเมินเวลาที่สัตว์ทดลองใช้สำรวจ non familiar object หลังได้รับการป้อนสารทดสอบที่เวลา 30 นาที 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่าขนาดที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญไม่ว่าจะประเมินหลังได้รับสารสกัดไป 30 นาที, 6 ชั่วโมงหรือ 24 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลาการศึกษาครั้งนี้ ดังแสดงในรูปที่ 7-9



รูปที่ 7 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อ total exploration time ใน object recognition test หลังได้รับการป้อนสารทดสอบ 30 นาที (n=8/กลุ่ม) *P<.05เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle [b, c]P<.01 และ .001 เทียบกับกลุ่มควบคุม

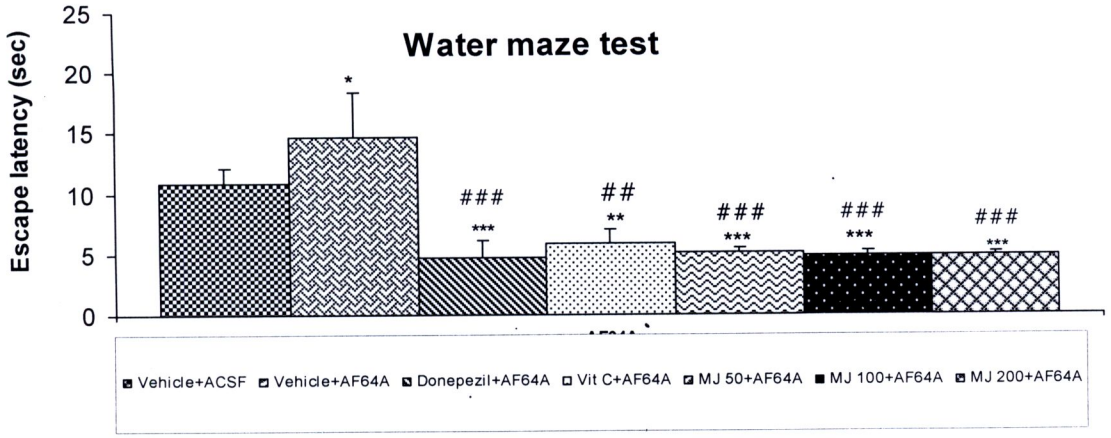


รูปที่ 8 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อ total exploration time ใน object recognition test หลังได้รับการป้อนสารทดสอบ 6 ชั่วโมง (n=8/กลุ่ม) *P<.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle [c]P<.001 เทียบกับกลุ่มควบคุม

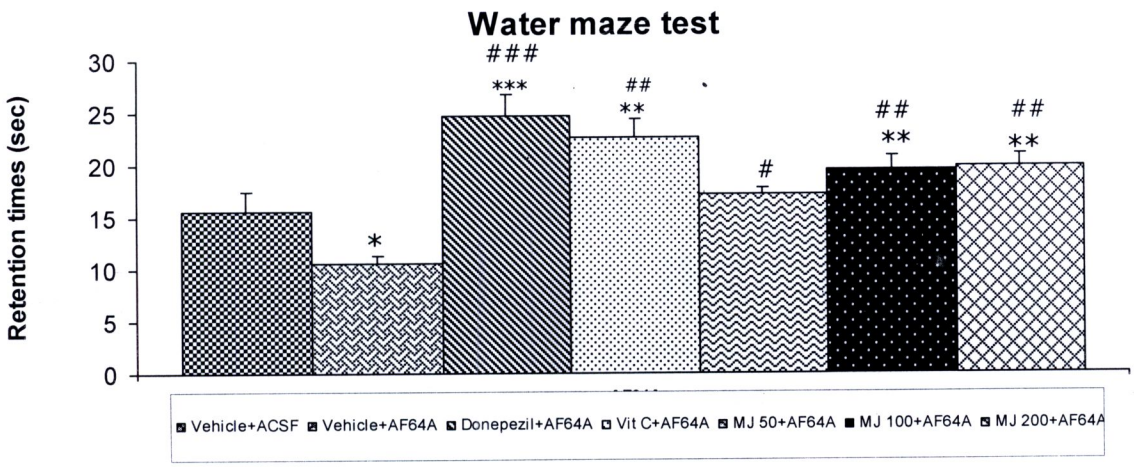


รูปที่ 9 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อ total exploration time ใน object recognition test หลังได้รับการป้อนสารทดสอบ 24 ชั่วโมง (n=8/กลุ่ม) *P<.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle °P<.001 เทียบกับกลุ่มควบคุม

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 ผลการศึกษาพบว่าทั้ง positive control และสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกสามารถลดความบกพร่องในการเรียนรู้และความจำได้ โดยสามารถลด escape latency (p-value<.001) ทั้งหมดเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle+ACSF และเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A)แต่เพิ่ม retention timeได้ อย่างมีนัยสำคัญ โดยหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ สารสกัดมะม่วงขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวจะเพิ่ม retention time ได้ดีกว่าสารสกัดมะม่วงขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ดังแสดงในรูปที่ 10-11

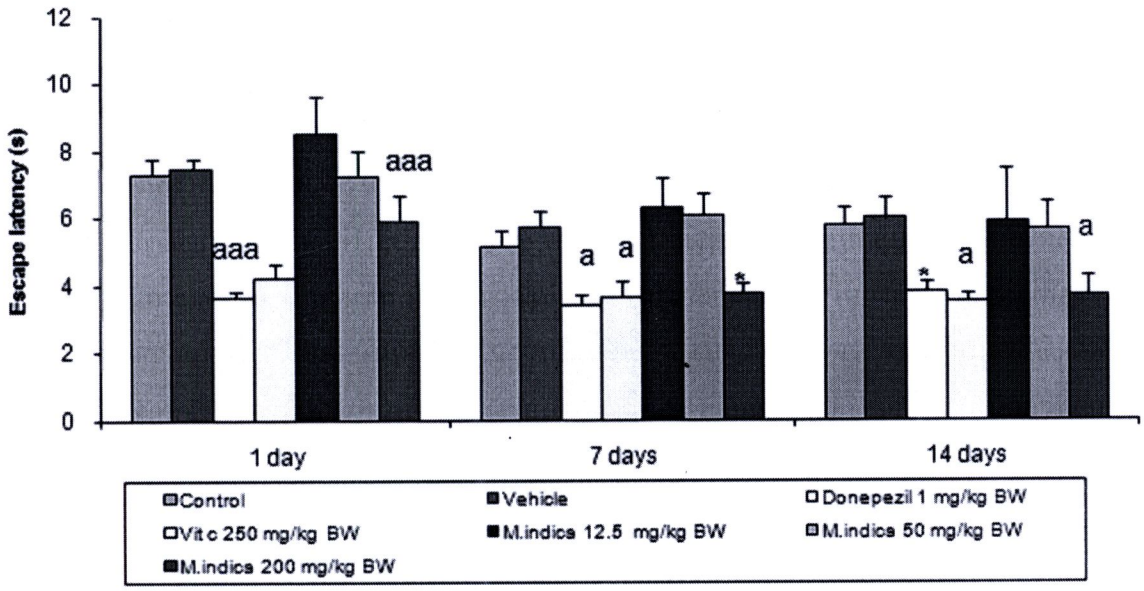


รูปที่ 10 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อเวลาที่หนูใช้ว่ายน้ำหาแท่นที่ซ่อนใต้น้ำ (escape latency time) ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่องด้วยสาร AF64A (n=8/กลุ่ม) *, **, ***P<.05; .01; .001 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle +ACSF $^{\#\#\#}$P< .001 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A

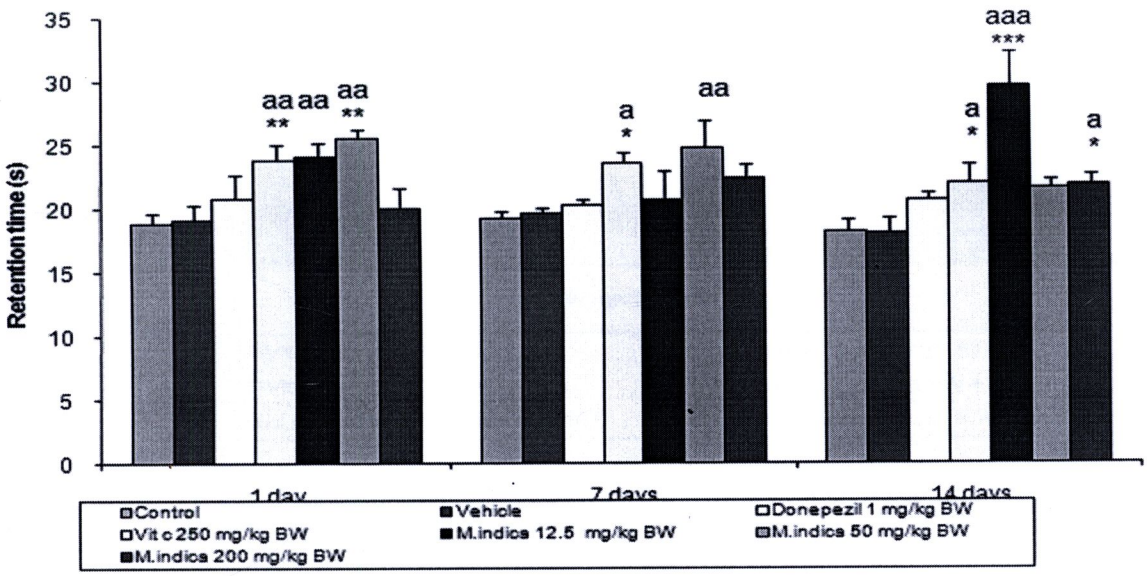


รูปที่ 11 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อ retention time ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่องด้วยสาร AF64A (n=8/กลุ่ม) *,**,***P<.05; .01; .001 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle +ACSF $^{\#}$, $^{\#\#}$, $^{\#\#\#}$P< .01 และ.001 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A

ผู้วิจัยได้นำสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกมาประเมินฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze test ดังที่กล่าวแล้วในข้างต้น โดยคำนวณปริมาณสารสกัดที่ equivalent กับปริมาณของสารสกัดน้ำที่ทดสอบโดยคำนวณจาก %yield ดังนั้นในกลุ่มทดลองที่สัตว์ทดลองจะได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงน้ำดอกไม้ในขนาด 12.5, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (เนื่องจากในการศึกษาช่วงแรกพบว่าระยะเวลาการ treat ต่างกันระหว่าง 2 และ 4 สัปดาห์ไม่มีผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ) พบว่ามีเพียงสารสกัดมะม่วงขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวที่จะสามารถลด escape latency โดยการได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาดดังกล่าวเพียงครั้งเดียวจะให้ผลดีกว่าการบริโภคเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ ดังแสดงในรูปที่ 12 เมื่อประเมินฤทธิ์สารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงสุกต่อ retention time และพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 12.5 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวไปครั้งเดียวสามารถเพิ่ม retention time ได้อย่างมีนัยสำคัญ (p-value<.01 ทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม vehicle) เมื่อขยายเวลาในการ treatment นานขึ้นเป็น 1 สัปดาห์จะพบการเปลี่ยนแปลงทำนองเดียวกันแต่มีเพียงขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเท่านั้นที่ให้ผลในการเพิ่ม retention time เมื่อเพิ่มระยะเวลาการ treatment ต่อไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์จะพบว่ามีเพียงหนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 12.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวที่ลด escape latency อย่างมีนัยสำคัญ (p-value<.001 เทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม vehicle) ดังแสดงในรูปที่ 13

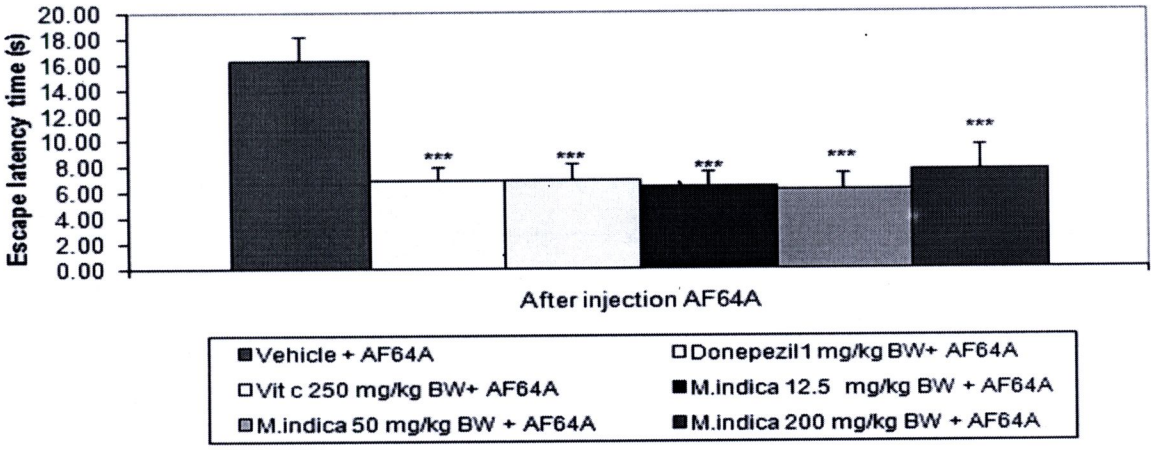


รูปที่ 12 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 12.5, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อเวลาที่หนูใช้ว่ายน้ำหาแท่นที่ซ่อนใต้น้ำ (escape latency time) (n=8/กลุ่ม) $^{*,**,***}P<.05$; .01; .001 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle $^{a,\,aa,\,aaa}P<.05$; .01 และ .001 เทียบกับกลุ่มควบคุม

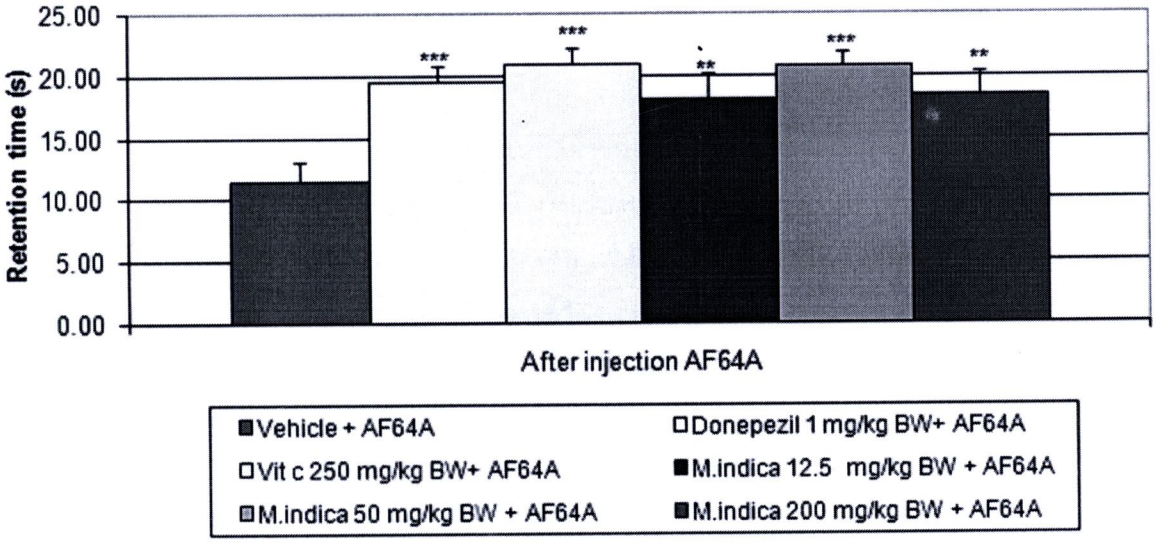


รูปที่ 13 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 12.5, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อ retention time (n=8/กลุ่ม) $^{*,**,***}P<.05; .01; .001$ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle $^{a, aa, aaa}P<.05; .01$ และ .001 เทียบกับกลุ่มควบคุม

อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์สารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุก ต่อการเรียนรู้และความจำในภาวะความจำบกพร่องพบว่าทั้ง positive control และ สารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกทุกขนาดสามารถสามารถลด escape latency แต่เพิ่ม retention time ในภาวะความจำบกพร่องขนาดในแบบจำลองความจำบกพร่องในโรคสมองเสื่อมได้ดังแสดงในรูปที่ 14-15



รูปที่ 14 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 12.5, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อเวลาที่หนูใช้ว่ายน้ำหาแท่นที่ซ่อนใต้น้ำ (escape latency time) ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่องด้วยสาร AF64A (n=8/กลุ่ม) ***P<.001 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle +AF64A



รูปที่ 15 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 12.5, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อretention time ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่องด้วยสาร AF64A (n=8/กลุ่ม) ***P<.001 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle +AF64A

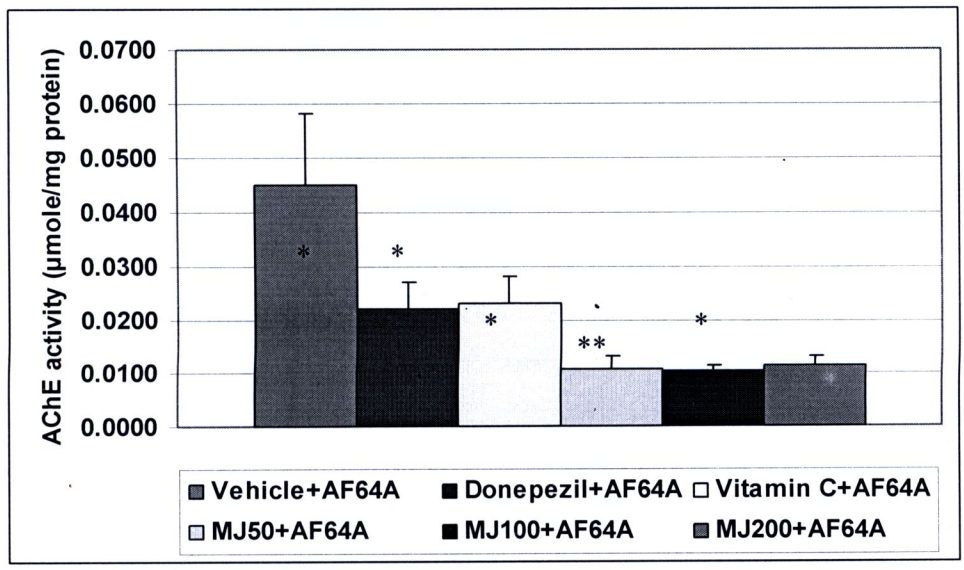
ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกทั้งสารสกัดน้ำและแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ป้องกันและลดความบกพร่องในเรื่องการเรียนรู้โดยเฉพาะการเรียนรู้และความจำที่เกี่ยวข้องกับทิศทางใน

แบบจำลองโรคสมองเสื่อมได้ดี อย่างไรก็ตามในภาวะปกตินั้นจะพบว่าสารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกจะให้ผลเพิ่มการเรียนรู้ได้ดีกว่าสารสกัดแอลกอฮอล์ เนื่องจากรูปแบบการเปลี่ยนแปลง escape latency และ retention time ที่เกิดจากการให้สารสกัดมะม่วงสุกมีลักษณะคล้ายกับ donepezil และ vitamin C ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดมะม่วงสุกอาจออกฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้โดยผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase และ ผ่านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งจะทำให้มี survival neuron ในสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำดีขึ้น อย่างไรก็ตามกลไกที่แน่ชัดยังคงต้องการการศึกษาต่อไป

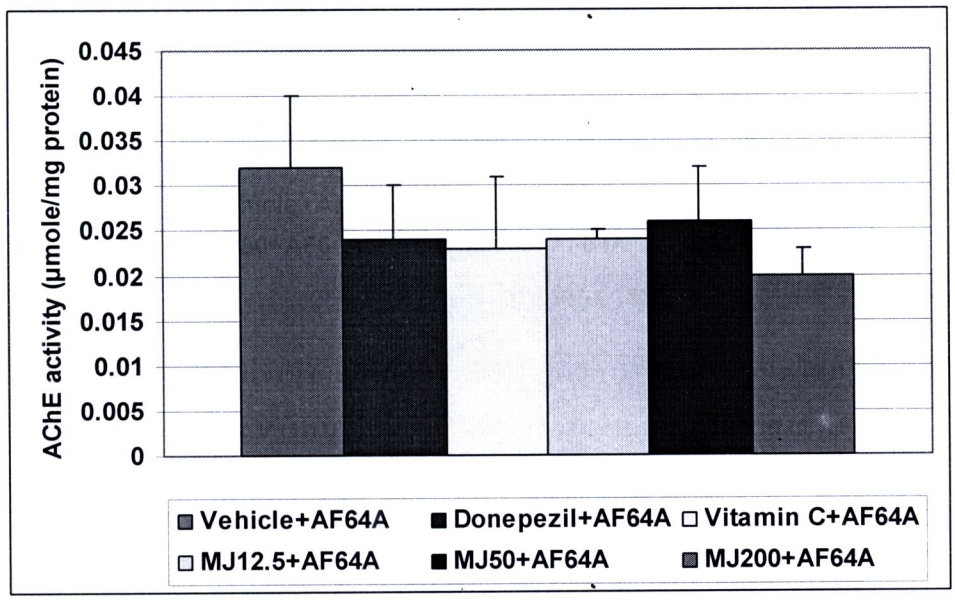
การศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบ dose dependent study ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากสารสกัดที่ทดสอบเป็น crude extract ประกอบด้วยองค์ประกอบจำนวนมาก ดังนั้นจึงอาจพบ masking effect จากองค์ประกอบอื่นที่มาบดบังฤทธิ์ที่สนใจของ active ingredient ได้ หรืออาจเป็นผลจากการที่ความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดมะม่วงสุกและการเรียนรู้และความจำอาจไม่ใช่ simple relationship แต่ออกฤทธิ์ผ่าน signal transduction หรือ mediator อื่นๆทำให้ไม่พบ dose dependent study

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดระดับ total phenolic compound ในสารสกัดมะม่วงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีระดับ total phenolic compound ประมาณ 513.79±27.17 mg of gallic acid equivalent (GAE)/mg fruit weight และได้ส่งตรวจวัดปริมาณสาร beta carotene 47.21 μg/g

เพื่อให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ได้ทำการศึกษาฤทธิ์สารสกัดมะม่วงต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) พบว่าสารสกัดน้ำของมะม่วงน้ำดอกไม้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ AChE ใน hippocampus ซึ่งเป็นบริเวณที่มีบทบาทสำคัญในเรื่องการเรียนรู้และความจำพบว่าสารสกัดน้ำของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกสามารถกดการทำงานของเอนไซม์ AChE ได้ดีทุกขนาดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และที่น่าสนใจคือขนาดของการเปลี่ยนแปลงไม่ต่างจากที่พบจากหนูที่ได้รับ donepezil และ vitamin C อย่างไรก็ตามหนูที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในรูปที่ 16-17 ดังนั้นฤทธิ์ในการเพิ่มการเรียนรู้และความจำของสารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกน่าจะออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งผ่านการกดการทำงานดังกล่าวทำให้มีปริมาณ acetylcholine ที่เหลืออยู่บริเวณ synapse เพิ่มขึ้นและสามารถออกฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้และความจำดีขึ้น ในขณะที่กลไกการเพิ่มการเรียนรู้และความจำของสารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงน้ำดอกไม้นั้นน่าจะผ่านกลไกอื่น เช่นการเพิ่ม survival neuron ทำให้มีเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้เพิ่มขึ้นและอาจมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของ neurotransmitter ที่มีอิทธิพลต่อการเรียนรู้และความจำ



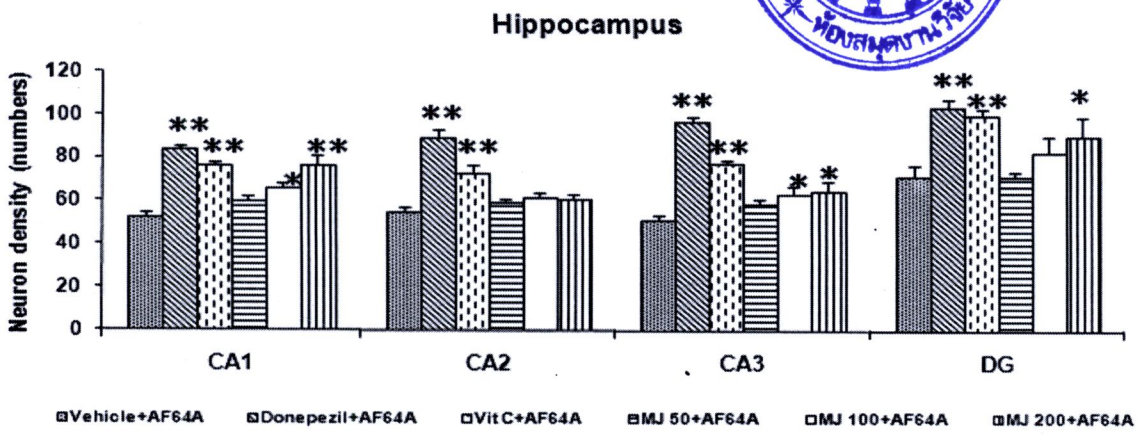
รูปที่ 16 แสดงฤทธิ์สารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาดต่างๆต่อการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ใน hippocampus ของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่องด้วยสาร AF64A (n=8/กลุ่ม)
*,** P<.05; .01 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A



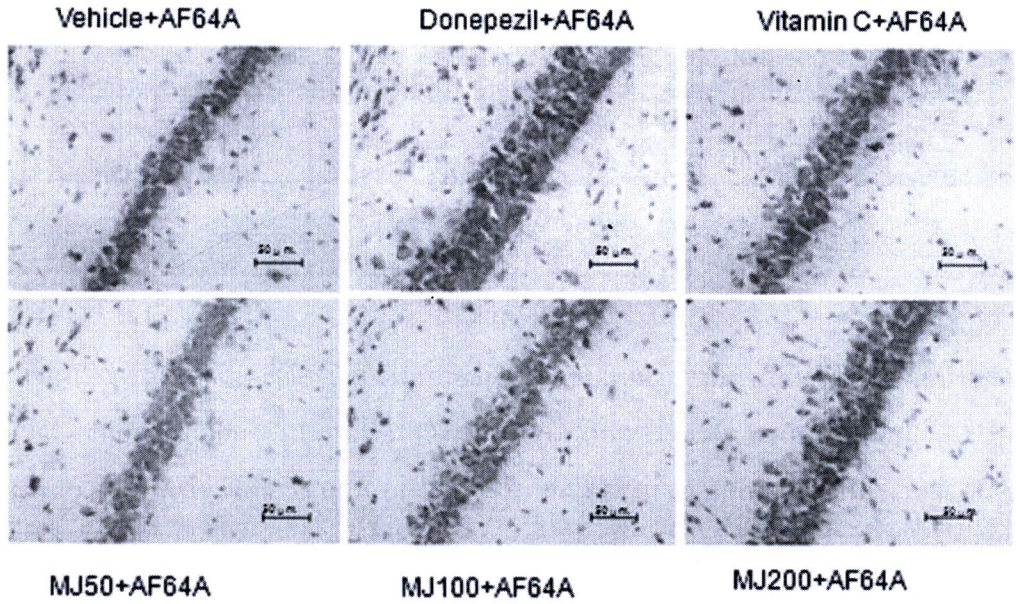
รูปที่ 17 แสดงฤทธิ์สารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาดต่างๆต่อการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ใน hippocampus ของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่องด้วยสาร AF64A (n=8/กลุ่ม)

เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความรุนแรงของความจำบกพร่องสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงประเมินฤทธิ์สารสกัดน้ำของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกซึ่งมีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองได้ทั้งในภาวะความจำบกพร่องซึ่งจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อมและภาวะปกติต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทบริเวณต่างๆ ของ hippocampus โดยแบ่งหนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ เป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ 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 เข้าไปในโพรงสมองต่ออีกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำสัตว์ทดลองมาประเมินความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ซึ่งเป็นสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ จากรูปที่ 18 ทั้ง donepezil และ vitamin C สามารถต้านฤทธิ์ดังกล่าวของ AF64A ได้ในทุกบริเวณของ hippocampus นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดน้ำของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวสามารถต้านฤทธิ์ของ AF64A โดยพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวและ AF64A จะมีความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในสมองส่วน CA1, CA3 และ dentate gyrus (p-value$<.05$ ทั้งหมดยกเว้นความหนาแน่นของเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว p-value$<.01$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A) ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวและ AF64A จะมีความหนาแน่นของเซลล์ประสาทเพิ่มขึ้นเฉพาะบริเวณ CA1 และ CA3 (p-value$<.05$ ทั้งหมดเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A) และไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของดัชนีที่กล่าวข้างต้นในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 12.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก

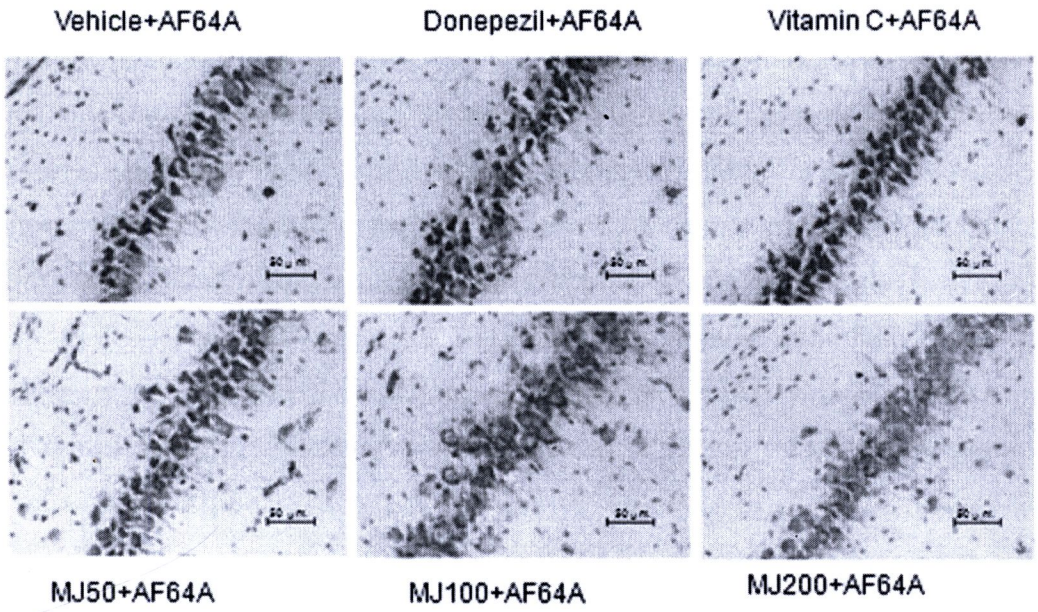
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



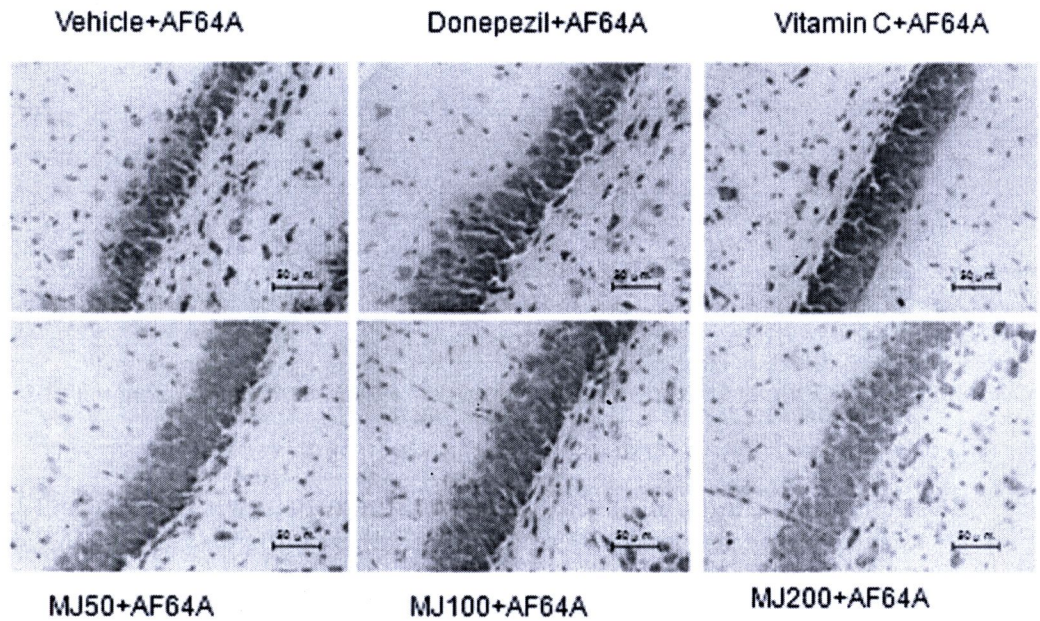
รูปที่ 18 แสดงฤทธิ์สารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทบริเวณ hippocampus ในแบบจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) ซึ่งเหนี่ยวนำโดย AF64A (n=8/กลุ่ม) $^{*,**}P<.05; .01$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A



รูปที่ 19 Photomicrograph แสดงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในบริเวณ CA1 ของ hippocampus ที่กำลังขยาย 40X ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดน้ำของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในแบบจำลองโรคสมองเสื่อมที่เหนี่ยวนำโดย AF64A

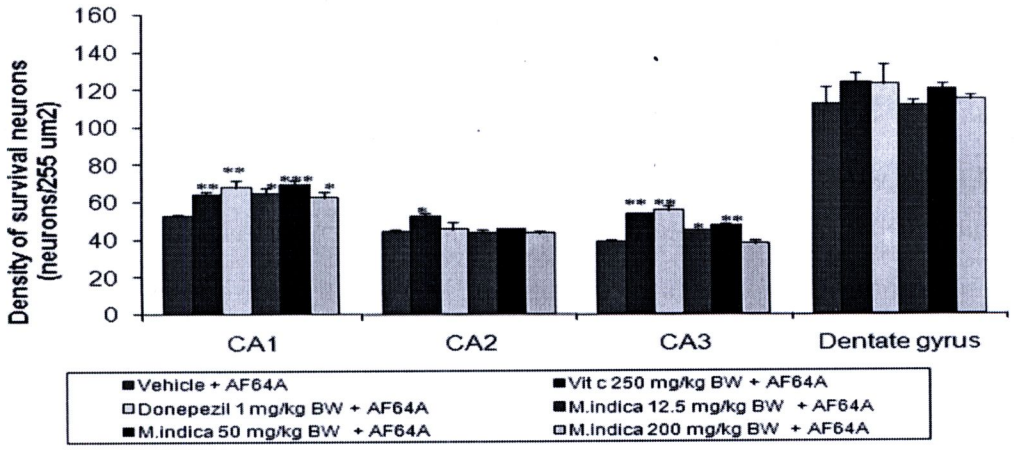


รูปที่ 20 Photomicrograph แสดงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในบริเวณ CA3 ของ hippocampus ที่กำลังขยาย 40X ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดน้ำของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในแบบจำลองโรคสมองเสื่อมที่เหนี่ยวนำโดย AF64A

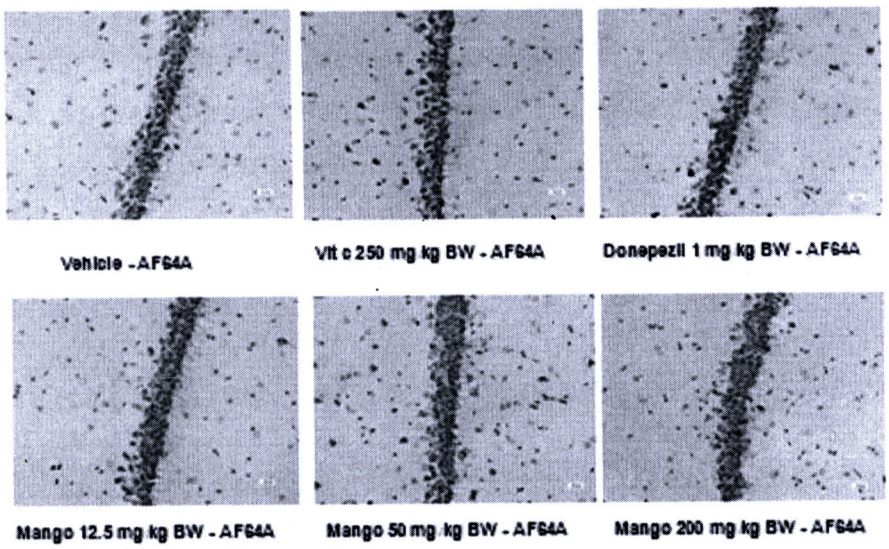


รูปที่ 21 Photomicrograph แสดงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในบริเวณ dentate gyrus ของ hippocampus ที่กำลังขยาย 40X ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดน้ำของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในแบบจำลองโรคสมองเสื่อมที่เหนี่ยวนำโดย AF64A

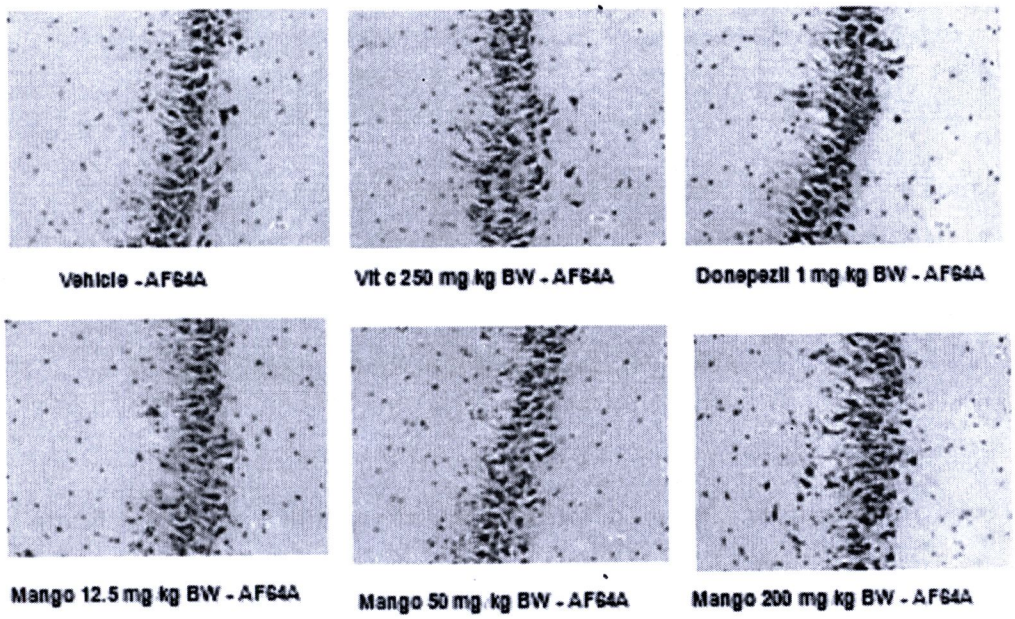
เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์สารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาดต่างๆต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ประสาท ช่วงนี้จะต่างกับช่วงที่ทำการศึกษาฤทธิ์สารสกัดน้ำของแอลกอฮอล์แม้จะได้รับ intervention ต่างกัน โดยเฉพาะในสมองบริเวณ dentate gyrus ซึ่งเป็นบริเวณที่มี glucocorticoid receptor ซึ่งเป็น receptor ของ stress hormoneหนาแน่น[28] ทั้งนี้อาจเป็นผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงฤดูกาลเนื่องจากมีรายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลมีผลกระทบต่อการตอบสนองต่อความเครียด[29] และความเครียดเองก็มีผลต่อการตายของเซลล์ประสาทโดยเฉพาะใน hippocampus[30] อย่างไรก็ตามยังคงพบการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกัน โดยหนูกลุ่มที่ได้รับ donepezil และ vitamin C มีแนวโน้มมีความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในบริเวณต่างๆ ของ hippocampus มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ vehicle และ AF64A แต่หนูกลุ่มที่ได้รับ vitamin C จะมีการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ประสาทอย่างมีนัยสำคัญในสมองบริเวณ CA1, CA2 และ CA3 ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับ donepezil จะมีความหนาแน่นของเซลล์ประสาทเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะบริเวณ CA1 และ CA3 พบการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญ (p-value<.01 ทั้งหมดเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle และ AF64A) หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 12.5 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวและ AF64A จะมีความหนาแน่นของเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 (p-value<.05 และ .001 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle และ AF64A) และ CA3 (p-value<.05 และ.01 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle และ AF64A)อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวและ AF64A จะมีความหนาแน่นของเซลล์ประสาทเพิ่มขึ้นเพียงในบริเวณ CA1 (p-value<.05 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle และ AF64A)



รูปที่ 22 แสดงฤทธิ์สารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทบริเวณ hippocampus แบบจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) ซึ่งเหนี่ยวนำโดย AF64A (n=8/กลุ่ม) *,**,***P<.05; .01; .001 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A

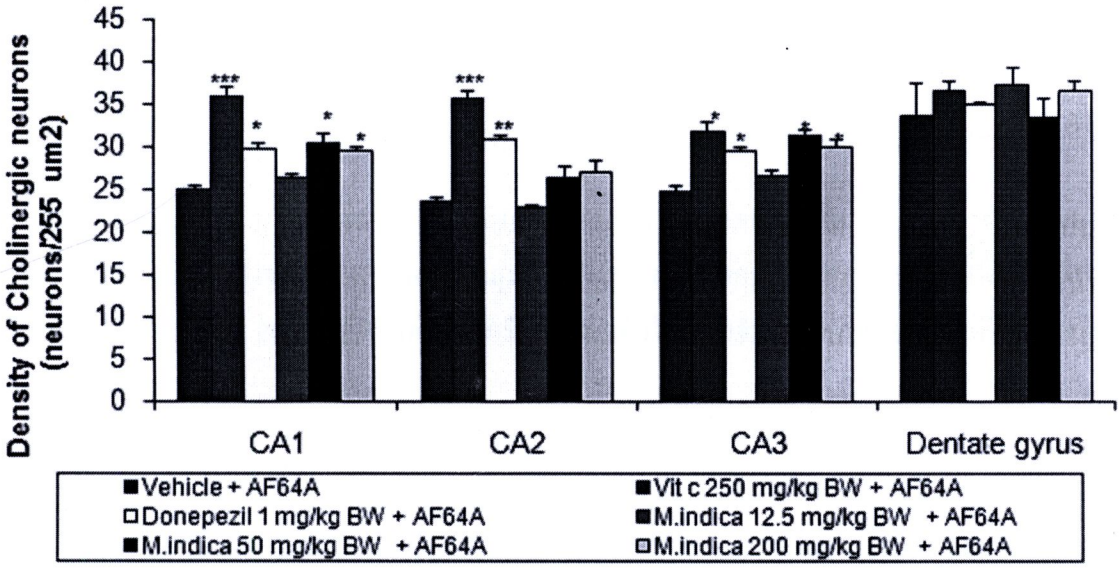


รูปที่ 23 Photomicrograph แสดงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในบริเวณ CA1 ของ hippocampus ที่กำลังขยาย 40X ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 12.5, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในแบบจำลองโรคสมองเสื่อมที่เหนี่ยวนำโดย AF64A

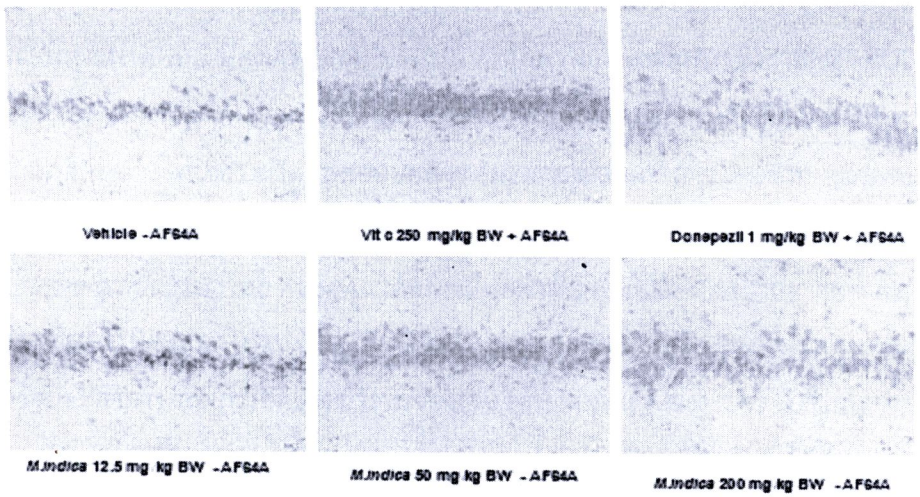


รูปที่ 24 Photomicrograph แสดงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทในบริเวณ CA3 ของ hippocampus ที่กำลังขยาย 40X ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 12.5, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในแบบจำลองโรคสมองเสื่อมที่เหนี่ยวนำโดย AF64A

เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์สารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทโคลิเนอร์จิก พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ donepezil และกลุ่มที่ได้รับ vitamin C แล้วนำมาเหนี่ยวนำความจำบกพร่องด้วย AF64A มีความหนาแน่นของเซลล์ประสาทโคลิเนอร์จิกเพิ่มขึ้นในทุกบริเวณยกเว้นใน dentate gyrus หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเองมีความหนาแน่นของเซลล์ประสาทโคลิเนอร์จิกเพิ่มขึ้นในบริเวณที่กล่าวข้างต้นเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 25



รูปที่ 25 แสดงฤทธิ์สารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทโคลิเนอร์จิกบริเวณ hippocampus ในแบบจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) ซึ่งเหนี่ยวนำโดย AF64A (n=8/กลุ่ม)
*,**,***P<.05; .01; .001 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A



รูปที่ 26 Photomicrograph แสดงความหนาแน่นของเซลล์ประสาทโคลิเนอร์จิกในบริเวณ CA3 ของ hippocampus ที่กำลังขยาย 40X ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุก ขนาด 12.5, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในแบบจำลองโรคสมองเสื่อมที่เหนี่ยวนำโดย AF64A

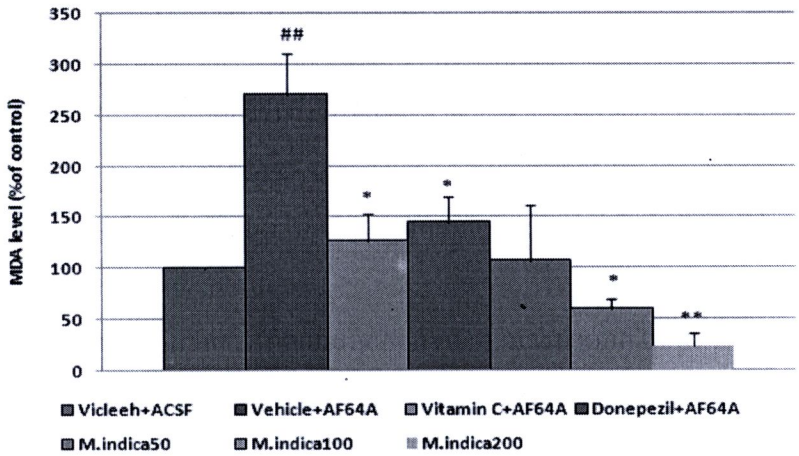
ดังนั้นจะเห็นว่าสารสกัดน้ำและสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า oxidative stress เป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งในการทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในโรคสมองเสื่อม (Anderson, 2004) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาฤทธิ์สารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการเปลี่ยนแปลง oxidative marker ที่สำคัญได้แก่ ระดับ malondialdehyde (MDA) และการทำงานของ scavenger enzymes ที่สำคัญได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ใน hippocampus

ในการศึกษาครั้งนี้จะแบ่งสัตว์ทดลองเป็นกลุ่มต่างๆดังนี้ 1) กลุ่มที่ได้รับ vehicle+ACSF(artificial cerebrospinal fluid) 2)กลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A 3)กลุ่มที่ได้รับ donepezil+AF64A 4) กลุ่มที่ได้รับ vitamin C+AF64A 5)-7) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว+AF64A ตามลำดับ จากรูปที่ 27 จะเห็นว่าทั้งหนูกลุ่มที่ได้รับ donepezil, vitamin C และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวและ AF64A จะมีระดับ MDA ใน hippocampus ลดลง (p-value$<.05$; .05; 05 และ .01 ตามลำดับเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A) donepezil และ vitamin C จะเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ SOD , CAT (p-value$<.05$ ทั้งหมดเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A) และเอนไซม์ GPx (p-value$<.01$ ทั้งหมดเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A) หนูที่ได้รับสารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกทุกขนาดจะมีการทำงานของเอนไซม์ CAT ใน hippocampus เพิ่มขึ้น (p-

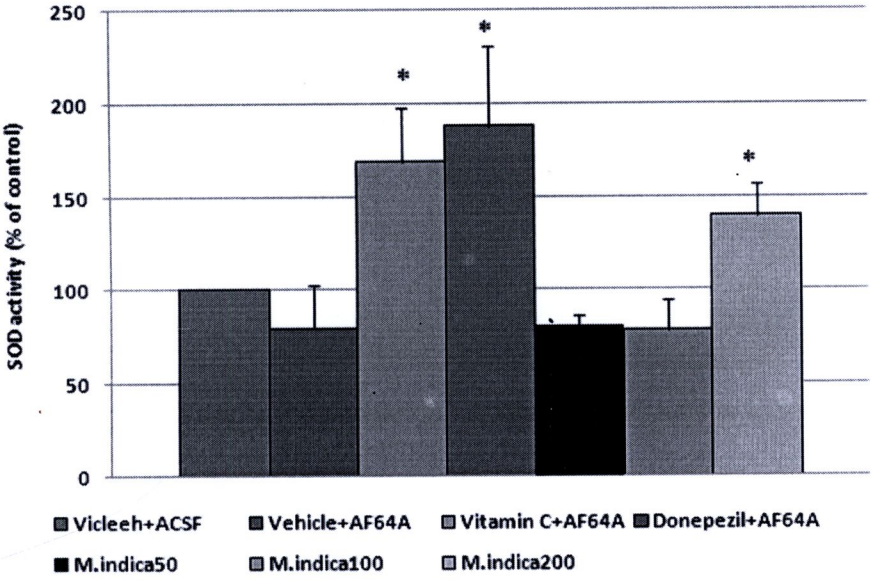
value<.05; .05 และ .01 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A) ในขณะที่มีเพียงหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวที่มีการเพิ่มการทำงานของ SOD และ GPx ในบริเวณดังกล่าว (p-value<.05 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A) ดังแสดงในรูปที่ 28-30

เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์สารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกพบว่าสารสกัดทุกขนาดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ 12.5, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวจะลดปริมาณ MDA ที่เพิ่มขึ้นใน hippocampus จากการเหนี่ยวนำโดย AF64A ได้อย่างมีนัยสำคัญ (p-value<.01; .01 และ .05 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A) ดังแสดงในรูปที่ 31 หนูที่ได้รับสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกทุกขนาดในการศึกษาครั้งนี้จะสามารถลดการกดการทำงานของเอนไซม์ SOD (p-value<.05; .05 และ .01 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A) และเอนไซม์ GPx (p-value<.01ทั้งหมดเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A) ที่เหนี่ยวนำโดย AF64A อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของเอนไซม์ CAT ดังแสดงในรูปที่ 32-34

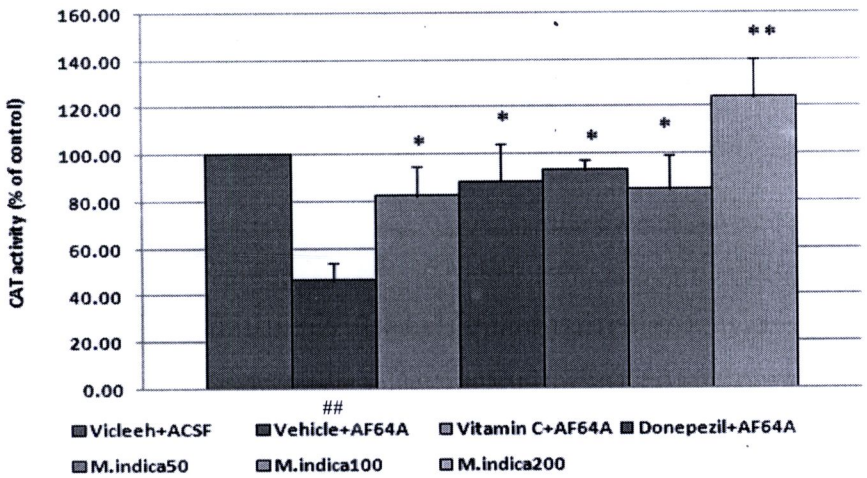
ดังนั้นการที่สารสกัดน้ำและสารสกัดแอลกอฮอล์ของมะม่วงน้ำดอกไม้สุกสามารถลดปริมาณ MDA ใน hippocampus ได้ส่วนหนึ่งน่าจะเป็นผลจากการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และส่งผลให้ลดการตายของเซลล์ประสาทในบริเวณดังกล่าวและการเพิ่มการเรียนรู้และความจำ อย่างไรก็ตาม น่าจะมาจากกลไกอื่นเช่นการลดการสร้างอนุมูลอิสระ



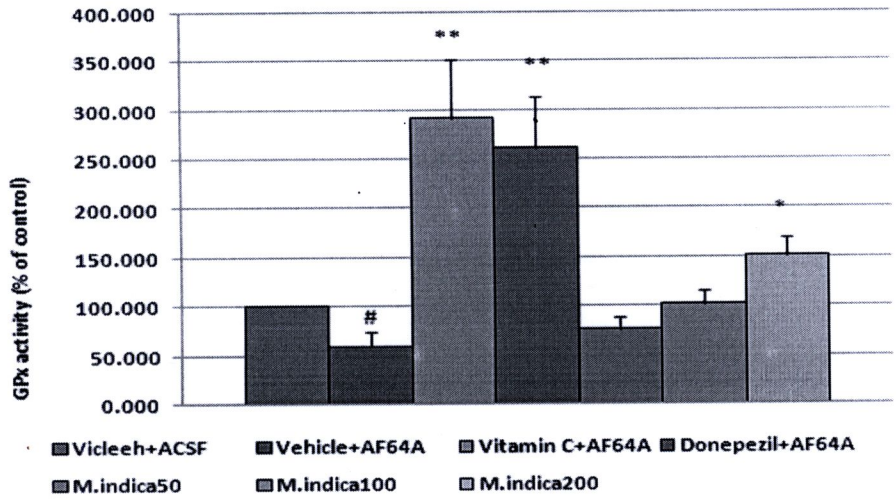
รูปที่ 27 แสดงฤทธิ์สารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ malondialdehyde ในสมองบริเวณ hippocampus ในแบบจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) ซึ่งเหนี่ยวนำโดย AF64A (n=8/กลุ่ม) ##P<.01 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+ACSF ; *,***P<.05; .01 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A



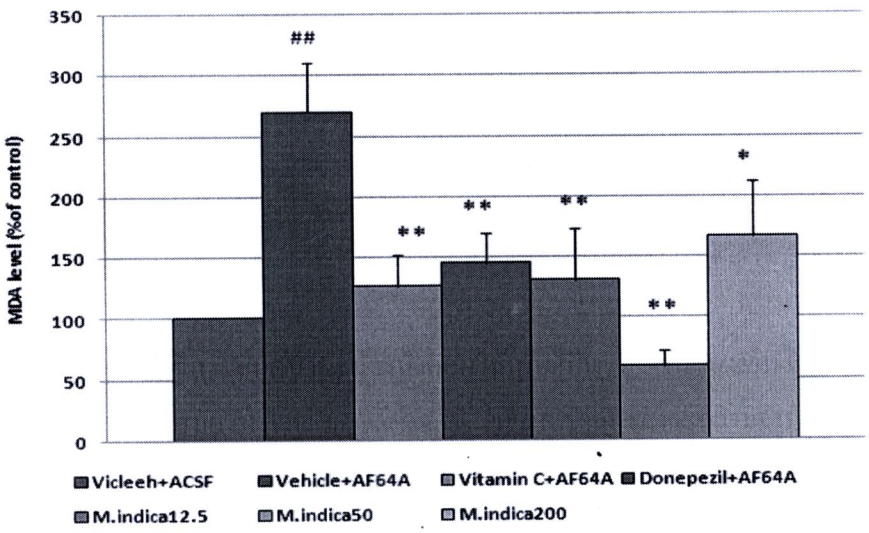
รูปที่ 28 แสดงฤทธิ์สารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการทำงานของเอนไซม์superoxide dismutase (SOD) ในสมองบริเวณ hippocampus ในแบบจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) ซึ่งเหนี่ยวนำโดย AF64A (n=8/กลุ่ม) $^{*,***}P<.05; .01$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A



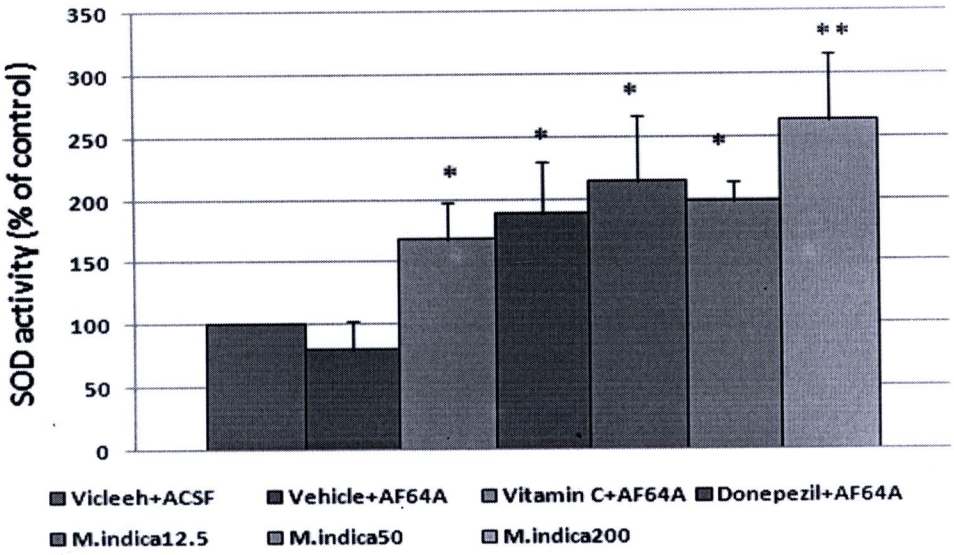
รูปที่ 29 แสดงฤทธิ์สารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการทำงานของเอนไซม์ catalase (CAT) ในสมองบริเวณ hippocampus ในแบบจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) ซึ่งเหนี่ยวนำโดย AF64A (n=8/กลุ่ม) $^{##}P<.01$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+ACSF ; $^{*,***}P<.05; .01$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A



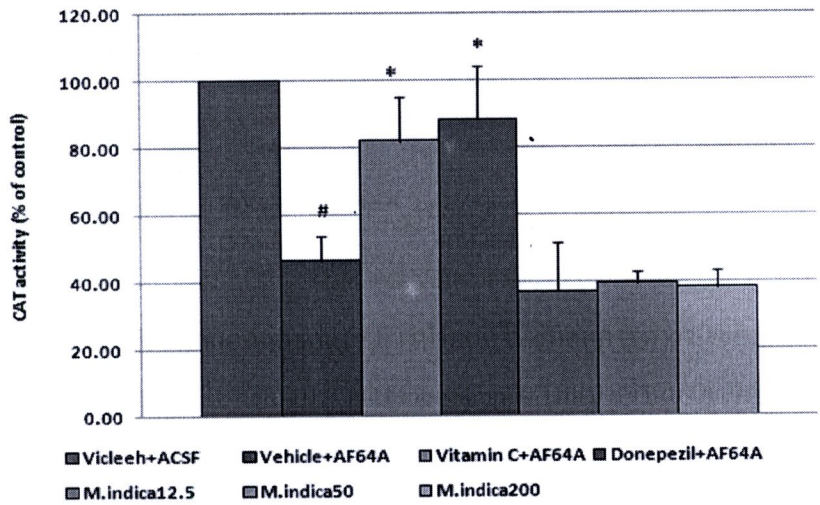
รูปที่ 30 แสดงฤทธิ์สารสกัดน้ำมะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ในสมองบริเวณ hippocampus ในแบบจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) ซึ่งเหนี่ยวนำโดย AF64A (n=8/กลุ่ม) $^{\#}P<.05$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+ACSF ; $^{**}P< .01$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A



รูปที่31 แสดงฤทธิ์สารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ malondialdehyde ในสมองบริเวณ hippocampus ในแบบจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) ซึ่งเหนี่ยวนำโดย AF64A (n=8/กลุ่ม) $^{\#\#}P<.01$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+ACSF ; $^{*,**}P<.05; .01$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A



รูปที่ 32 แสดงฤทธิ์สารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการทำงานของเอนไซม์superoxide dismutase (SOD) ในสมองบริเวณ hippocampus ในแบบจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) ซึ่งเหนี่ยวนำโดย AF64A (n=8/กลุ่ม) $^{*,**}P<.05$; .01 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A



รูปที่ 33 แสดงฤทธิ์สารสกัดแอลกอฮอล์มะม่วงน้ำดอกไม้สุกต่อการทำงานของเอนไซม์ catalase (CAT) ในสมองบริเวณ hippocampus ในแบบจำลองภาวะความจำบกพร่องของโรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) ซึ่งเหนี่ยวนำโดย AF64A (n=8/กลุ่ม) $^{\#}P<.05$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+ACSF ; $^{*}P<.05$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+AF64A